Eine Modifikation der Disc-Elektrophorese zur Untersuchung von Muskelproteinen aus bioptisch gewonnenem Gewebe.

WERNER K. ANTL

1968

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41545804_0053

AUS DER II. MEDIZINISCHEN KLINIK DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN
Direktor: Prof.Dr.Dr.G.Bodechtel

EINE MODIFIKATION DER DISC-ELEKTROPHORESE ZUR UNTERSUCHUNG VON MUSKELPROTEINEN AUS BIOPTISCH GEWONNENEM GEWEBE.

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Werner K. Antl
aus Hochstadt/Main

München 1968

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. F. Mittelbach
Mitberichterstatter: Prof. Dr. Dr. G. Bodechtel
Dekan: Prof. Dr. F. Holle

Tag der mündlichen Prüfung: 2.7.1968

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

		Seite
I.	EINLEITUNG	5
II.	PROBLEMSTELLUNG	8
III.	THEORIE DER DISC-ELEKTROPHORESE	10
IV.	METHODIK DER DISC-ELEKTROPHORESE	13
	1. Geräte und Chemikalien	13
	2. Normale Ausführung	15
	3. Modifikation	18
V.	DIREKTE GEWEBSELEKTROPHORESE VON MUSKEL-PROTEINEN DES KANINCHENS, DER RATTE UND DES MENSCHEN: ERGEBNISSE UND VERGLEICHE	21
	1. Kaninchen	21
	2. Ratte	28
	3. Mensch	34
VI.	DISKUSSION	42
VII.	ZUSAMMENFASSUNG	49
VIII.	LITERATURVERZEICHNIS	50

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

EINLEITUNG

Die Versuche, elektrisch geladene Substanzen im Gleichstromfeld zu trennen, reichen bis in die Mitte des vorigen Jahrhunderts zurück.
Den Begriff der Elektrophorese führte 1909 MICHAELIS in Deutschland ein. Aber erst 1937 wurde von TISELIUS die Form der freien Elektrophorese im NERNST'schen U-Rohr zur Trennung des menschlichen Serums in drei Fraktionen, die er als α -, β - und γ - Globuline bezeichnete, entwickelt (95).
Verschiedene Bemühungen, die freie Elektrophorese (moving - boundary electrophoresis) durch die Verwendung eines festen Trägermediums zu ersetzen, und damit die Voraussetzung für eine methodisch einfachere und zur klinischen Untersuchung heranziehbaren Möglichkeit der Eiweißtrennung zu schaffen, führten schließlich zur Papierelektrophorese. Diese in den Jahren 1950/51 von mehreren Arbeitsgruppen, darunter GRASSMANN, HANNIG und KNEDEL, für die klinische und biologische Forschung entwickelte Methode, ist vor allem in der medizinischen Routineuntersuchung zu einem wertvollen Bestandteil geworden (37). Obwohl sie gerade hier auch in Zukunft nicht so schnell durch eine andere ersetzt werden kann, da sie die wesentlichen pathologischen Veränderungen in der Eiweißzusammensetzung des Serums ausreichend erfaßt, erwies sie sich doch für die medizinische und biologische Forschung auf speziellen Gebieten als zu grob und unempfindlich, als daß man mit ihrer Hilfe noch weitere Aufschlüsse über differenziertere Probleme hätte bekommen können.
Eine Weiterentwicklung auf diesem Gebiet stellte die Einführung von Trägermedien dar, die nicht die Adsorptionserscheinungen des Filterpapiers besaßen, sondern den Bedingungen der freien Elektrophorese sich annäherten. Als Substanzen dafür boten sich Gele an, deren hoher Wassergehalt zugleich mit der mehr oder weniger festen Konsistenz sehr gute Voraussetzungen für eine erhöhte Trennfähigkeit ergaben. Vor allem Agargel, Stärkegel und Polyacrylamidgel haben verbreitetste Anwendung in der experimentellen Forschung gefunden.

Die ersten Hinweise auf eine Agargelelektrophorese gab schon KENDALL 1923-1926 (53), jedoch erst dreißig Jahre später erfuhr diese Technik einen neuen Aufschwung, wobei besonders auf die Immunelektrophorese von GRABAR und WILLIAMS (1953) zu verweisen ist (35). Einfachheit der Zubereitung, Fehlen der Adsorption für die meisten Proteine, optische Eigenschaften und die Modifikationsmöglichkeiten von der Mikro- bis zur direkten Gewebselektrophorese eröffneten dieser Methode ein weites Anwendungsfeld.
Erlaubte die Agargelelektrophorese nur die Auftrennung der Proteine nach ihren elektrischen Ladungsunterschieden, so berücksichtigte das Stärkegel als Trägermedium, erstmals angegeben von SMITHIES 1955 (91), auch die unterschiedlichen Molekülgrößen (Siebeffekt), so daß durch die Kombination dieser beiden Wirkungsmechanismen ein System mit extrem hohen Auflösungsvermögen entstand. Es wurden damit teilweise hervorragende Ergebnisse erzielt, so gelang z. B. SMITHIES und WALKER (1956) die Differenzierung der verschiedenen Haptoglobintypen in menschlichen Seren (92). Nachteilig wirkt sich allerdings die umständliche Arbeitsanordnung und der Zeitaufwand, den man bei diesem Verfahren veranschlagen muß, aus. Um möglichst schnell ähnlich gute Ergebnisse zu erhalten, suchte man deshalb nach weiteren Substanzen, die ebenso vorteilhafte Eigenschaften wie das Stärkegel hatten.

Das synthetische Polyacrylamidgel brachte hier den entscheidenden Fortschritt der letzten Jahre auf dem Gebiet der Elektrophorese, denn wie das Stärkegelmedium vereint auch es den erwähnten Molekülsiebeffekt mit dem normalen elektrophoretischen Auftrennungsvermögen.
Die Vorzüge dieser von DAVIS und ORNSTEIN (19, 72), sowie RAYMOND und WEINTRAUB 1959 (77) unabhängig voneinander aufgefundenen Polyacrylamidgelelektrophorese bestehen einmal in der einfachen und schnellen Zubereitung, wobei die Porengröße je nach Belieben reproduzierbar verändert werden kann, zum andern in der hohen chemischen und mechanischen Stabilität über weite pH - Bereiche, sowie seiner Transparenz, einem wesentlichen Vorteil gegenüber dem Stärkegel. Das Gel trägt zudem keinerlei ionische Gruppen; eine Elektroosmose, wie sie beim Agargel zu beobachten

ist, tritt aus diesem Grund fast nicht auf.
In der vorliegenden Arbeit wird eine spezielle Methode, die Disc-Elektrophorese mit Polyacrylamidgel nach ORNSTEIN und DAVIS auf ihre Brauchbarkeit für die direkte Gewebselektrophorese untersucht.

PROBLEMSTELLUNG

Mit den fortschreitenden Verfeinerungen der elektrophoretischen Trennung war es möglich, nun auch über die Proteinzusammensetzung der verschiedensten Körpersubstanzen Aufschlüsse zu gewinnen. War die Papierelektrophorese des Serums zwar schon ein fester Bestandteil der üblichen klinischen Untersuchung geworden, so konnte man doch mit ihr bei der Auftrennung von Gewebsextrakten keine grossen Erfolge erzielen.

Erst die Gelelektrophoresen brachten hier einen Fortschritt. In diesem Zusammenhang gewann die Frage an Bedeutung, inwieweit sich bei den einzelnen Muskelerkrankungen pathologische Veränderungen im Proteinbereich nachweisen ließen. Die elektrophoretische Analyse bot sich als die dafür geeignete Methode an, und von mehreren Autoren wurden bereits versuche mit Muskelextrakten, sowohl mittels der freien Elektrophorese, als auch mit den verschiedenen Trägermedien, vor allem Stärkegel, durchgeführt.

In der klinischen Diagnostik ist es jedoch nicht immer leicht, genügend große Mengen an Muskel zur Herstellung von Extrakten zu erhalten, noch dazu, wenn es sich um bioptisches Material, das für histologische und histochemische Untersuchungen dienen soll, handelt.

Mikroelektrophoresen, für die eine Proteinmenge von 10^{-7} - 10^{-9}g noch ausreichend ist, wurden zwar beschrieben (21, 32, 75), doch sind diese Methoden in der Ausführung teilweise etwas kompliziert und nur für ganz spezielle Untersuchungen angezeigt. Ein weiterer Nachteil besteht in der zeitraubenden Herstellung des durch Homogenisierung und Zentrifugation des Muskelgewebes gewonnenen Extraktes, zudem ergeben sich Unterschiede der in Lösung gegangenen Proteine, jeweils nach der Zusammensetzung und Ionenstärke des zur Extraktion verwendeten Puffers.

Eine Möglichkeit die Eiweißtrennung mit den geringen vorhandenen Substanzmengen durchzuführen, sowie den Arbeitsaufwand auf ein Minimum zu beschränken, bietet die unmittelbare Einbringung von Gewebsschnitten in ein geeignetes Elektrophoresesystem.

Einige Versuche dieser Art sind in der Literatur angegeben worden (21, 102), die Ergebnisse wurden jedoch an Genauigkeit und Schärfe von den Extraktelektrophoresen bis jetzt immer übertroffen.
Auch die von uns im Agar- und Stärkegel, letztere mit der vertikalen Anordnung nach SMITHIES, erhaltenen Resultate der direkten Gewebselektrophorese waren im Vergleich zur Trennung des Muskelextraktes nicht sehr erfolgreich (Abb. 3).
Eine homogene Verteilung des Gewebes in einem Gelschlitz war bei diesem Verfahren unmöglich, die Kontinuität des Elektrophresemilieus wurde dadurch ebenfalls ziemlich in Mitleidenschaft gezogen und mehr als eine verwaschene, unscharf begrenzte und grobe Proteinauftrennung konnte auf diese Weise nicht erreicht werden. Hier ergab sich nun durch die Anwendung der sog. Disc-Elektrophorese eine Möglichkeit, die oben genannten Schwierigkeiten weitgehend auszuschalten. Auch auf Grund anderer Vorteile, auf di später noch näher eingegangen werden soll, erwies sich gerade diese Methode als die brauchbarste Lösung des Problems einer reproduzierbaren, genauen und einfachen direkten Gewebselektrophorese. Neben der routinemäßigen histologischen und histochemischen ist mit ihr ohne weiteres auch eine elektrophoretische Untersuchung mit der, bei einer einmaligen Muskelbiopsie gewonnenen Substanzmenge, durchführbar.

THEORIE DER DISC-ELEKTROPHORESE

Die von ORNSTEIN und DAVIS entwickelte Disc-Elektrophorese (73, 72) erhielt ihren Namen durch zwei Merkmale, einmal durch die Darstellung der Proteinfraktionen als flache Scheibchen (discoid shape), zum anderen auf Grund des verwendeten diskontinuierlichen Puffersystems. Die Elektrophorese findet in Glasröhrchen statt, in denen drei verschiedene Gelschichten zur Polymerisation gebracht werden. Als Trägersubstanz wird Polyacrylamid verwendet, dessen schon erwähnte Variationsbreite die Herstellung von Gelen verschiedenster Porengröße ermöglicht.

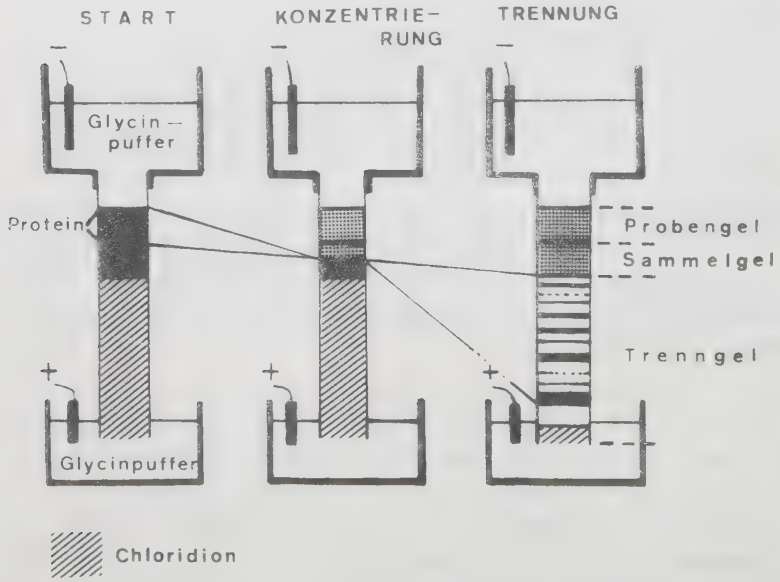


Abb. 1. Schematische Skizzierung des Trennungsvorgangs bei der Disc-Elektrophorese (nach ORNSTEIN).

Eine kurz zusammengefaßte Wiedergabe der Theorie von ORNSTEIN über das diskontinuierliche Puffersystem, das die Disc-Elektrophorese auszeichnet, soll erläutern, wie man sich die außerordentliche Trennkapazität dieser Methode zu erklären hat (72).

Schon POULIK berichtete bei Versuchen mit Stärkegel von einem derartigen System und stellte eine Verbesserung der Ergebnisse fest (73). Dabei beobachtete er eine, das Gel von einem Ende zum andern durchwandernde Pufferfront. ORNSTEIN und DAVIS untersuchten die, mit diesem Phänomen zusammenhängenden Veränderungen in der elektrophoretischen Anordnung näher, wobei sie als Elektrodenpuffer ein TRIS (Trishydroxymethylaminomethan) - Glycingemisch und als Gelpuffer TRIS und 1 n HCl benutzten. Das kleinporige Trenngel setzt sich aus 7 %igem Polyacrylamid und TRIS-HCl-Puffer mit einem pH-Wert von 8,9, das großporige Sammelgel (spacergel) und Probengel (samplegel) aus 2,5 %igem Polyacrylamid und TRIS-HCl pH 6,7 zusammen.
Der Elektrodenpuffer ist so gewählt, daß das Glycinion (pK_a = 9,8) im pH-Bereich des großporigen Gels eine kleinere elektrische Wanderungsgeschwindigkeit als die der Proteine hat, im Trenngel bei pH 8,9 jedoch eine, die größer als die aller Proteine ist. Das Glycinion bildet das sog. " trailing ion ". Das Chloridion im Gelpuffer hingegen hat im Vergleich zu den anderen die größte Beweglichkeit und stellt das führende Ion, das sog. " leading ion " , dieses Systems dar.
Beim Anlegen der Spannung wandern die führenden Chloridionen vom Anfang des Probengels nach unten, und zwar schneller als die nachfolgenden Glycinionen, so daß zwischen den beiden eine Zone verminderter Leitfähigkeit und damit ein größerer Spannungsabfall entsteht. In diesem Spannungsgradienten wird das " trailing ion " beschleunigt und schließt zum " leading ion " auf.

Diese Front der beiden Ionenarten durchwandert gemeinsam das Gel und ist bei genauer Beobachtung als Schlierengrenze deutlich zu erkennen. Auf ihrem Weg durch das Probengel überholt sie alle sich dort befindlichen Proteine; da jedoch diese bei pH 6,7 eine Beweglichkeit, geringer als die der Chloridionen, aber höher als der Glycinionen haben, sammeln sie sich sämtlich im Abschnitt zwischen den beiden Ionenfronten an, schon gestaffelt, je nach den einzelnen Wanderungsgeschwindigkeiten.
Auf diese Weise gelangen die Proteine als eine, in einer extrem schmalen Zone maximal konzentrierten Schicht an die Grenze zwi-

schen Sammel- und Trenngel. Hier erreicht das Glycinion auf Grund des pH-Wechsels eine größere Beschleunigung und eilt nun den Proteinen voran. Die " leading ion / trailing ion " Grenze, die sich jetzt abgesetzt hat, hinterläßt einen Bereich mit relativ konstantem pH-Wert und Spannungsgradienten, in dem die zu trennenden Substanzen einer normalen Zonenelektrophorese nach ihrer elektrischen Beweglichkeit, sowie Molekülgestalt und - größe unterworfen werden.
Diese Form der Elektrophorese gestattet also durch den Konzentrationseffekt die Anwendung von sehr kleinen Substanzmengen, gleichzeitig schafft sie auch außerordentlich dünne Startzonen und erreicht damit scharfe und stark verbesserte Trennungen.

Von manchen Autoren wurde allerdings bezweifelt, ob die Disc-Elektrophorese anderen Polyacrylamidelektrophoresen, die auf dem herkömmlichen kontinuierlichen Puffersystem beruhen, unbedingt überlegen sei. Zudem empfanden sie die Benützung von gesonderten Proben- und Sammelgelen als störend, sowohl methodisch als auch funktionell.
Die Gründe sollen hier nicht diskutiert werden, nähere Angaben sind in der Literatur zu finden (79, 45).
Für die Zwecke der von uns untersuchten direkten Gewebselektrophorese sind derartige Überlegungen nicht weiter bedeutungsvoll, da allein schon die apparative Anordnung den Ausschlag für die Anwendung dieser speziellen Technik gab. Eine zusätzlich verbesserte Auftrennung durch die beschriebenen Mechanismen läge daher nur in unserem Interesse.

METHODIK DER DISC-ELEKTROPHORESE +)

I. Die Geräte, die für die Disc-Elektrophorese gebraucht werden, sind verhältnismäßig einfach und lassen sich leicht ohne größere Kosten beschaffen oder selbst herstellen.

1. Als Behälter für den Elektrodenpuffer diente eine dreiteilige Kühlschrankschachtel aus Kunststoff. In den Boden des obersten Behälters wurden in symmetrischer Anordnung acht Löcher, Durchmesser 14 mm, gebohrt, in den mittleren, genau darunterliegend, die gleiche Anzahl mit dem Durchmesser von 8 mm.
2. 11 cm lange Glasröhrchen mit einem inneren Querschnitt von 5 mm wurden bei 2,5 cm und 4 cm markiert.
3. Zur Elektrophorese steckt man die fertig vorbereiteten Röhrchen in durchbohrte Gummistöpsel von Serumtestgläschen, führt sie durch die Löcher der beiden oberen Teile der Kühlschrankschachtel, dreht die Gummistöpsel fest und setzt das Ganze auf den untersten Behälter.
4. Als Elektroden verwendet man an Steckkontakthülsen gelötete Platindrähte, die durch Löcher im Zentrum des Deckels und des mittleren Behälters in den Elektrodenpuffer eintauchen.

Als Spannungsquelle benötigt man ein Gerät, das 50 mA bei 300 V liefern kann.

Eine Kühlung ist normalerweise nicht erforderlich, doch kann sie notfalls durch eine kleine Änderung ermöglicht werden. Man dichtet dazu die Bohrungen im mittleren Behälter um die Glasröhrchen mit Gummiringen ab und leitet über zusätzliche Zu- und Abflußöffnungen Kühlwasser hindurch.

+) Die Arbeit wurde mit Unterstützung der Friedrich-Baur-Stiftung, München und der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt.

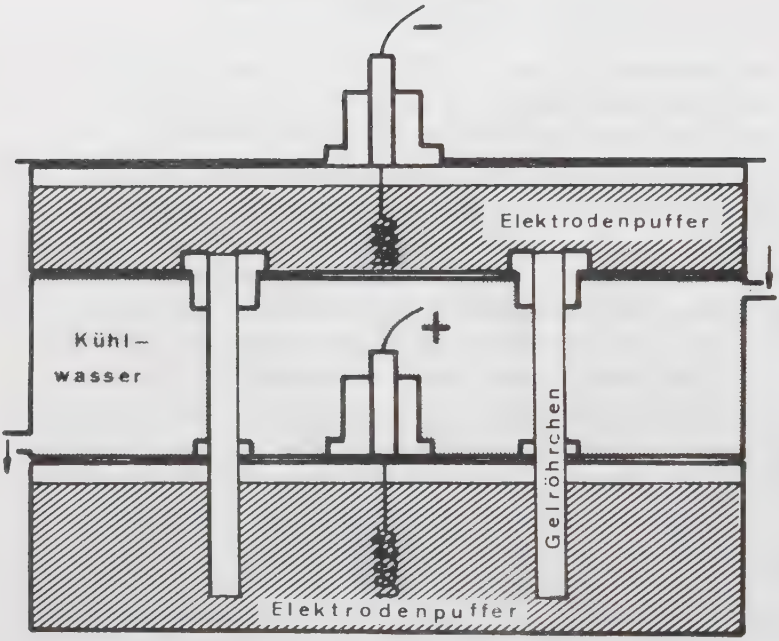


Abb. 2. Schematische Darstellung des apparativen Aufbaus der Disc-Elektrophorese.

An Chemikalien werden gebraucht:

Acrylamid
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylaethylendiamin)
BIS (N,N'-Methylenbisacrylamid)
TRIS (2-Amino-2-(Hydroxymethyl)-1,3-propandiol)
Ammoniumperoxydisulfat
Glycin, Riboflavin, Saccharose, Amidoschwarz,
1 n HCl, 1 n H_3PO_4, Essigsäure.

Folgende Lösungen können in braunen Flaschen längere Zeit aufbewahrt werden. (Im Gegensatz zur Originalmethode von DAVIS kam für das großporige Gel statt TRIS-HCl-Puffer ein TRIS-Phosphat-Puffer pH 6,9 zur Anwendung (105)).

A			B		
1 n HCl	48,0 ml		1 m H_3PO_4	25,6 ml	
TRIS	36,6 g	pH 8,9	TRIS	5,7 g	pH 6,9
TEMED	0,23 ml		TEMED	0,46 ml	
aq. dest. auf	100 ml		aq. dest. auf	100 ml	

C		D	
Acrylamid	28,0 g	Acrylamid	10,0 g
BIS	0,735 g	BIS	2,5 g
aq. dest. auf	100 ml	aq. dest. auf	100 ml

Die weiteren Lösungen sollten möglichst im Kühlschrank aufbewahrt werden, das Ammoniumperoxydisulfat wird nach 14 Tagen jeweils neu angesetzt.

E	F	G
Riboflavin 4,0 mg	Saccharose 40 g	Ammoniumperoxydis. 140 mg

jeweils mit aq. dest. auf 100 ml

Elektrodenpuffer : Glycin 28,8 g
TRIS 6,0 g pH 8,3
mit aq. dest. auf 2 l

II. Zunächst erfolgt die Beschreibung der normalen Ausführung der Elektrophorese mit flüssigen Körpersubstanzen oder Extrakten.

Die Glasröhrchen werden mit einer kleinen Glasbürste grob gesäubert, in RBS 25 gereinigt, anschließend mit Leitungswasser und aq. dest. gespült und getrocknet. Zur Hälfte durchbohrte Gummistopfen verschließen das markierte untere Ende der Röhrchen und durch eine lange Hohlnadel werden noch vorhandene Ver-

unreinigungen am Boden der Stöpsel mit dem Gelpuffer B beseitigt.

Es empfiehlt sich, die erforderlichen Polymerisationsmischungen immer erst kurz vor Gebrauch aus den Grundlösungen A - G herzustellen, um eine Selbstpolymerisation zu vermeiden. Das großporige Proben- und Sammelgel setzt sich zusammen aus:

a.) 1 Teil B, 1 Teil E, 2 Teile D, 4 Teile F.

Für das Trenngel ergibt sich folgende Verteilung:

b.) 1 Teil A, 1 Teil H_2O, 2 Teile C, 4 Teile G.

In eine ausreichende Menge der Lösung a wird nun soviel der vorher auf ihren Eiweißgehalt geprüften Probe eingebracht, daß nach Einfüllen des Gels bis zur Marke 2,5 cm jedes Röhrchen etwa 200-400 γ Protein enthält. Bei Untersuchung von Extrakten mit Eiweißkonzentrationen wie die des Serums, sind das 4 - 8 μl, die zur Auftrennung gelangen.

Um eine glatte Oberfläche zu erhalten, wird das Probengel vorsichtig mit einem Tropfen Wasser überschichtet und dann 20 Minuten lang zwischen zwei parallel verlaufende Leuchtstoffröhren gestellt. Das Verschwinden der Gelbfärbung, welche durch das Riboflavin hervorgerufen wird, und das Auftreten einer leichten Trübung zeigen die Photopolymerisation des Gels an.

Man gießt nun die überstehende Flüssigkeit ab, spült erneut mit Puffer B nach und füllt das Röhrchen diesmal nur mit der Lösung a bis zur Markierung bei 4 cm. Nach Überschichtung mit Wasser und anschließender Polymerisation ist die Herstellung der großporigen Gelabschnitte beendet.

Der nächste Schritt besteht in der Zubereitung der Trenngelmischung b, von der für acht Röhrchen etwa 16 ml benötigt werden. Die sich über dem Sammelgel befindende Restflüssigkeit läßt man wieder ausfließen und benetzt darauf die Innenwand der Röhrchen mit dem Puffer A. Eine Verletzung der Oberfläche des Sammelgels ist möglichst zu vermeiden, da, sollen keine unregelmäßigen oder schiefen Proteinbanden auftreten, die Grenzfläche zum Trenngel unversehrt und homogen sein muß.

Das auf das Sammelgel bis zum Oberrand der Röhrchen aufgebrachte

Polymerisationsgemisch benötigt keine künstliche Beleuchtung, die Reaktion tritt durch die Wirkung des Ammoniumperoxydisulfats unter Luftabschluß ein, weshalb es erforderlich ist, auch das Trenngel mit etwas Wasser zu überschichten. Die Polymerisation ist nach 30 Minuten abgeschlossen, was durch die Ausbildung einer scharfen Grenze zwischen Gel und Wasser zu erkennen ist.
Die Gummistopfen, die bis zu diesem Zeitpunkt das eine Ende der Röhrchen verschlossen und sie in vertikaler Position hielten, werden vorsichtig abgezogen und durch die vollständig durchbohrten Stöpsel ersetzt. Am Trenngelende bringt man, um Lufteinschlüsse beim Eintauchen in den unteren Elektrodenpuffer zu vermeiden, noch einen hängenden Tropfen an und kann nunmehr die Röhrchen in der beschriebenen Weise in den Elektrophoreseapparat einführen. Die Spannung wird so angelegt, daß sich die Kathode oben befindet, und die Proteine im Gelzylinder anodisch nach unten wandern. Dabei läßt sich deutlich eine leicht bräunliche Schlierenfront ausmachen, die, wenn sie bis auf 0,5 - 1 cm an der unteren Grenze des Trenngels angelangt ist, gleichzeitig das Ende der Elektrophorese anzeigt.
Es wird teilweise angegeben, man solle zur besseren Kenntlichmachung der wandernden Puffergrenze dem oberen Elektrodenpuffer 1 ml einer 0,001 %igen Bromphenolblaulösung zufügen. Dadurch würde sich die Schlierengrenze durch den in derselben Schnelligkeit mitwanderndem Farbstoff gut erkennbar hervorheben; auf diese Maßnahme wurde jedoch verzichtet, da sich auch ohne Anfärbung die Wanderung dieser Zone ohne weiteres verfolgen läßt.
Nach Beendigung der Trennung zieht man die Glasröhrchen aus den Gummistopfen heraus und entfernt das Gel in ihrem Inneren. Dazu wird dieselbe, etwa 10 cm lange Hohlnadel benützt, die auch zur Füllung mit den verschiedenen Polymerisationslösungen zur Anwendung kamen. Zur Lösung des an den Glaswänden haftenden Gels wird Glyzerin in eine 10 cm^3 - Spritze aufgezogen, anschließend führt man vorsichtig die Kanüle in den oberen Teil der Röhrchen ein und lockert durch Umfahren und Einspritzen des Glyzerins diesen Abschnitt des Trenngels. Darauf wird das Gel auch von der unteren Seite auf dieselbe Art von den Wänden gelöst und gleitet nun leicht

aus den Glasröhrchen heraus.
Die Schwierigkeiten, die manche Autoren beim Entfernen des Gels beobachteten, wurden durch dieses beidseitige Umfahren und Lösen mit der Spritzennadel weitgehend ausgeschaltet, und die Gelzylinder blieben so fast immer unbeschädigt und unzerkratzt.
Zum Anfärben und Fixieren der Proteine bringt man die Gele eine Stunde lang in eine Mischung aus 1,1 %igem Amidoschwarz und 7,5 %iger Essigsäure. Die Entfärbung geschieht mühelos ebenfalls auf elektrophoretischem wege in einem zweiten Behälter, der genauso aufgebaut ist, wie der, den man zur Elektrophorese selbst benützt. Die Glasröhrchen dieses Apparates, die zur Aufnahme des Gels einen entsprechend größeren Durchmesser haben, sind an ihrem unteren Ende durch eine etwa 1 cm dicke polymerisierte Schicht der Trenngellösung b verschlossen. Die Entfärbeflüssigkeit, bestehend aus 7,5 %iger Essigsäure, kann somit ungehindert die Gläschen von der oberen zur unteren Kammer durchströmen und entfernt nach ca. 2 - 3 Stunden den negativ geladenen überschüssigen Farbstoff. Die Polung der Elektroden erfolgt wieder so, daß oben die Kathode und unten die Anode ist.
Wer die Entfärbezeit abkürzen will, sei auf einen Artikel verwiesen, in dem eine spezielle Apparatur beschrieben wird, worin die Gelzylinder nicht der Länge nach, sondern von der Seite her durchströmt werden und schon nach 6 Minuten soweit vom Farbstoff befreit sind, daß sie mit dem Auge beurteilt werden können (88). Aufbewahrt werden die Gelsäulen in kleinen, mit Essigsäure (7,5 %ig) gefüllten Reagenzgläsern.
In der Abb. 4 wird die, mit dieser Methode erreichbare Auftrennung eines Normalserums mit entsprechender densitometrischer Auswertungskurve gezeigt.

III. Zur direkten Gewebselektrophorese wurde die Grundanordnung der im vorigen dargestellten Technik beibehalten, die verwendeten Lösungen wurden ebenfalls unverändert übernommen. Wesentlich abweichend davon geschieht jedoch die Einbringung der zu untersuchenden Probe.
Das unterste großporige Gel wird diesmal unvermischt eingefüllt und polymerisiert und dient im Grunde genommen nur zur Abdeckung

der Probe gegen den Elektrodenpuffer. Von einer Lösung aus Gelpuffer B und Saccharose im Verhältnis 1 : 4 trägt man pro Röhrchen 0,02 ml auf das Gel auf. Nun schneidet man im Kryostaten von dem, durch Biopsie gewonnenen Muskel, der zum Zweck der histochemischen Untersuchung in flüssigem Stickstoff eingefroren wurde, eine gewisse Anzahl 40 μ dicker Schnitte. Bei einer Anschnittfläche von ungefähr 25 mm^2 sind etwa 2 Schnitte für ein Röhrchen ausreichend. Mit einem kleinen, 4 mm breiten Spatel werden die benötigten zwei Schnitte aufgenommen und so zusammengefaltet, daß sie, ohne unterwegs anzustreifen in die 0,02 ml Puffer-Saccharose-Flüssigkeit in den Röhrchen eingebracht werden können. Nach dem Abstreifen erfolgt anschließend durch Hin- und Herbewegen des Spatels eine grobe Zerkleinerung des Muskelgewebes, damit es sich möglichst homogen und eben auf die Geloberfläche auflegt. Noch schwebende größere Teilchen können mit der Spatelspitze durch leichtes Andrücken an den Gelboden fixiert werden. Sind alle acht Röhrchen auf diese weise gefüllt worden, schichtet man vorsichtig wieder großporiges Polymerisationsgemisch bis zur Marke 4 cm darüber.

Der weitere Arbeitsvorgang verläuft dann ohne Unterschied so, wie er unter II beschrieben wurde.

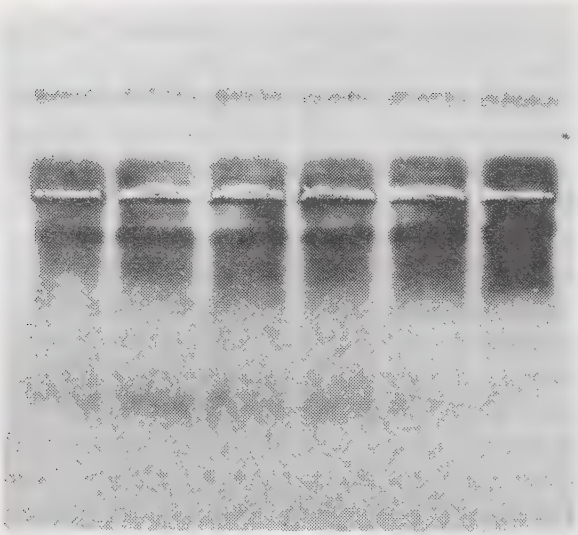


Abb. 3.

Vertikale Stärkegelelektrophorese nach SMITHIES. Muskelextrakt mit Boratpuffer pH 8,3. (Ratte).

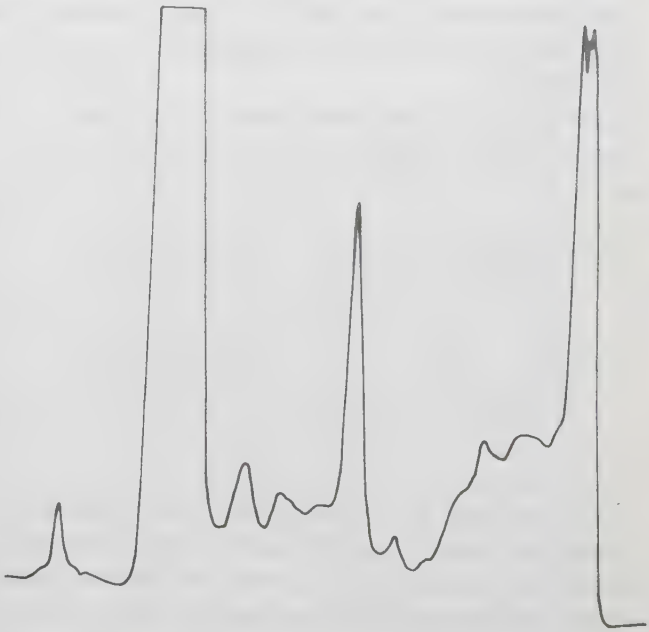


Abb. 4.

Disc-Elektrophorese eines Normalserums mit densitometrischer Auswertung.

DIRekTE GEWEBSELEKTROPHORESE VON MUSKELPROTEINEN DES KANINCHENS, DER RATTE UND DES MENSCHEN: ERGEBNISSE UND VERGLEICHE.

I. Kaninchen:

Von mit Äther getöteten und entbluteten Kaninchen wurden aus der Glutaealmuskulatur mehrere Muskelstücke auf Korkplättchen gebracht und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren.
Obwohl das Muskelgewebe sich in einigen Fällen bevor es zur Verwendung kam, bis zu 4 Monaten in der Kühltruhe bei - 20° C befand, ließ sich dennoch keine Änderung des Proteinmusters bei der elektrophoretischen Trennung feststellen. Auch bei Untersuchung eines Muskelstückes, das erst 2 Stunden nach dem Tod des Kaninchens entnommen wurde, ergab sich kein Unterschied zum Elektropherogramm des sofort exzidierten Gewebes.
Sind die Röhrchen in der angegebenen Reihenfolge zur Elektrophorese vorbereitet worden, stellt man zunächst eine Stromstärke von 40 mA ein und verfolgt die Schlierenfront, bis sie nach etwa 35 Minuten den Anfang des Trenngels erreicht hat. Dann erhöht man auf 50 mA bis zur Beendigung des Laufes (das entspricht etwa 6 mA pro Röhrchen). Im allgemeinen durchläuft die Puffergrenze die Gelsäulen in den einzelnen Röhrchen gleichmäßig schnell, so daß eine gute Vergleichsmöglichkeit der Ergebnisse gewährleistet ist. Falls jedoch die Wanderungsgeschwindigkeiten untereinander verschieden sein sollten, beruht das meistens darauf, daß das zuunterst eingefüllte großporige Gel nicht immer bis zum Boden der Gummistopfen polymerisiert war und sich daraus abweichende Widerstände und Stromstärken für einige Röhrchen ergaben. Ist durch diesen Umstand ein zu unregelmäßiger Versuchsverlauf zu erwarten, muß man den betreffenden Abschnitt nochmals mit Gel auffüllen und erneut polymerisieren lassen.
Die Zeitdauer für einen Versuch beträgt 65 - 80 Minuten, und zur Entfernung des Gels aus den Glaszylindern bis zur Fixation in der Färbelösung benötigt man in der Regel nicht mehr als 10 Minuten. Da die Diffusion im Polyacrylamidgel von vornherein sehr niedrig ist, bildet sie keine Beeinträchtigung der Versuche, was eine der Ursachen für die meist sehr scharfe Begrenzung der Proteinfraktionen ist.

Während der Elektrophorese läßt sich mit dem bloßen Auge eine bräunliche Eiweißbande erkennen, die nach Abschalten des Stromes ungefähr bis zur Mitte des Trenngels gewandert ist. Auf Grund der positiven Peroxydasereaktion ist anzunehmen, daß es sich bei dieser Fraktion vor allem um Myoglobin handelt, denn der verbliebene Hämoglobingehalt des Muskels nach Entblutung der Kaninchen dürfte nicht mehr einen derart großen Prozentsatz der aufgetrennten Eiweißmenge betragen, um eine Proteinschicht dieser Stärke hervorrufen zu können. Inwieweit Hämoglobin unter Umständen in dieser Zone mitwandert, muß noch geklärt werden, jedenfalls deutete sich bei einigen Versuchen eine Zweiteilung dieser Bande an. Auffällig war die, nach der Anfärbung mit Amidoschwarz in den meisten Fällen zu beobachtende charakteristische Zackung und unscharfe Begrenzung ihrer kathodischen Seite, während oberhalb und unterhalb dieses Abschnitts die Proteinscheibchen scharf und klar hervortraten. Eine Unregelmäßigkeit während des Laufes oder in der Gelzusammensetzung scheidet deshalb aus, einer käme als Erklärung für dieses Phänomen eine Interaktion zwischen dem Polyacrylamidgel und dieser Substanz oder wahrscheinlicher eine teilweise Denaturierung des Proteins selbst in Frage.

Durch eine Versuchsmodifikation wurde eine deutliche Auftrennung dieser unregelmäßig begrenzten Bande in eine schmale, scharfe Eiweißfraktion an der ursprünglichen Stelle und eine klar abgesetzte, langsamere, aber wiederum gezackte Zone erzielt (Abb. 5).

Die Schnitte befanden sich in diesem Fall zwischen zwei mit Puffer B getränkten Filterpapierscheibchen (4,5 mm Ø), die statt der freien Muskelschnitte zwischen die beiden großporigen Gele gebracht wurden. Das Gesamtbild änderte sich dadurch, abgesehen von der eben erwähnten Einzelheit besonders im oberen Teil des Gels, wo einige sonst nicht vorhandene starke Fraktionen auftraten, während im unteren Gelabschnitt die Auftrennung die gleiche blieb (Abb. 5.).
Näheren Aufschluß über die Homogenität einer bestimmten Fraktion kann auch die Variation der Trenngelporengröße geben (siehe Diskussion).

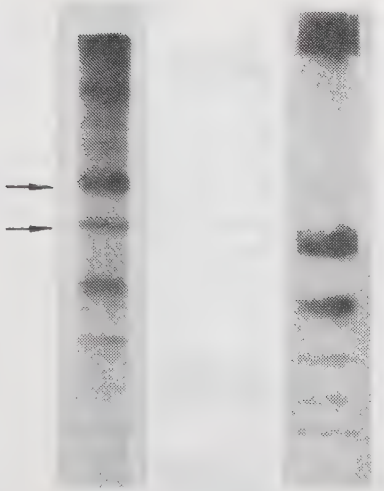


Abb. 5.
Die mit Pfeilen bezeichneten Fraktionen stellen die beiden Anteile der unregelmäßig begrenzten Bande dar.

Abb. 6.
Beispiel eines Versuchs, bei dem im Obergel ein starker Proteinanteil zurückgehalten wurde.

Die Serienbilder in Abb. 8 und 9 zeigen eine Übersicht über die für das Kaninchen typische Proteinverteilung nach normal durchgefuhrten Elektrophoresen. Man kann ihnen entnehmen, daß die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse, eine der Grundforderungen für eine Beurteilung, durchaus zu erreichen ist.
Sieben Proteinabschnitte sind grundsätzlich immer klar zu unterscheiden. Am Anfang des Gels bemerkt man in allen Fällen eine diffuse, stark angefarbte Proteinschicht, die manchmal überhaupt nicht in das Trenngel eindringt, sondern an der Sammel- Trenngelgrenze liegenbleibt (Abb. 6). Die Ursache dafür konnte nicht ermittelt werden. In der darauffolgenden ersten Hälfte des Gels bis zur gezackten Fraktion sind vereinzelte feine Banden zu sehen, die deutlicher zum Vorschein kommen, wenn noch ein Muskelschnitt zusätzlich eingebracht wird. (Abb. 9).
Anschließend an die prominente, peroxydasepositive Zone, welche ziemlich genau in der Mitte des Gels liegt, lassen sich vier Bereiche abgrenzen, in denen die hier wandernden heterogenen Eiweißsubstanzen sich oft nochmals in mehrere Unterfraktionen aufteilen. Obwohl auf möglichst konstante Versuchsbedingungen geachtet wurde, konnte eine stets gleichbleibende maximale Auftrennung in diesen Abschnitten nicht erreicht werden. Das charakteristische arteigene Grundmuster war jedoch durchwegs reproduzierbar.

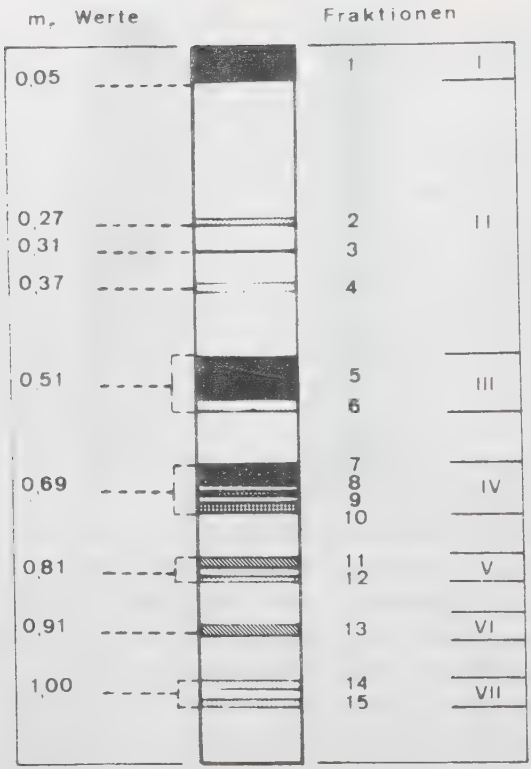


Abb. 7. Schematische Übersicht über die, mit der modifizierten Disc- Methode erhaltenen Proteinfraktionen des Kaninchenmuskels.

Um das visuelle Bild auch in Zahlen festzuhalten, bedienten sich viele Autoren, mangels anderer Differenzierungsmöglichkeiten, der Methode, die einzelnen Eiweißfraktionen nach ihrer relativen Beweglichkeit anzugeben. Zu diesem Zweck wird die Entfernung vom Anfang des Gels bis zur schnellsten Proteinbande (im Falle des Serums bis zur Mitte der Albuminfraktion) als 1,0 gesetzt, und die anderen werte werden je nach der Wanderungsstrecke interpoliert. Eine absolute Wanderungsgeschwindigkeit anzuführen ist unmöglich, da die Faktoren, die bei der Trennung eine Rolle spielen, zu unübersichtlich sind. In das Schema sind alle Fraktionen eingezeich-

net, die bei einer optimalen Elektrophorese gefunden werden können, wobei die Hauptgruppen, die in 100 % der Fälle zu erkennen sind, zusammengefaßt wurden. Außerdem sind noch die m_r - Werte (relative mobility) mit eingetragen.

Die quantitative graphische Auswertung der erhaltenen Resultate stößt auf erhebliche Schwierigkeiten, aus Gründen, die man schon bei der Papierelektrophorese in Erwägung zog. Eine direkt proportionale Anfärbung im Vergleich zum tatsächlichen Proteingehalt kann nicht ohne weiteres vorausgesetzt werden. Zudem vergrößert sich die Fehlerbreite noch durch den weiten Meßbereich, den man bei den großen Unterschieden in der optischen Dichte von der feinsten bis zur stärksten Bande einstellen muß.

Für die Auswertung unserer Ergebnisse wurde das " Double Beam Recording Microdensitometer M K III c" der Firma Joyce, Loebl & Co, Ltd., benützt (siehe Abb. 10).

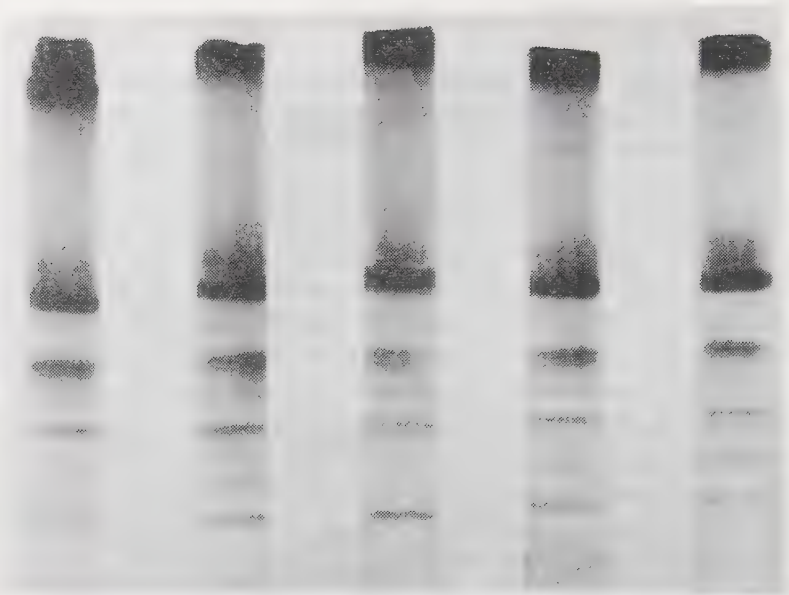


Abb. 8. Versuchsreihe mit Kaninchenmuskel. Aufgetragene Substanzmenge: Zwei 40 μ-Schnitte.

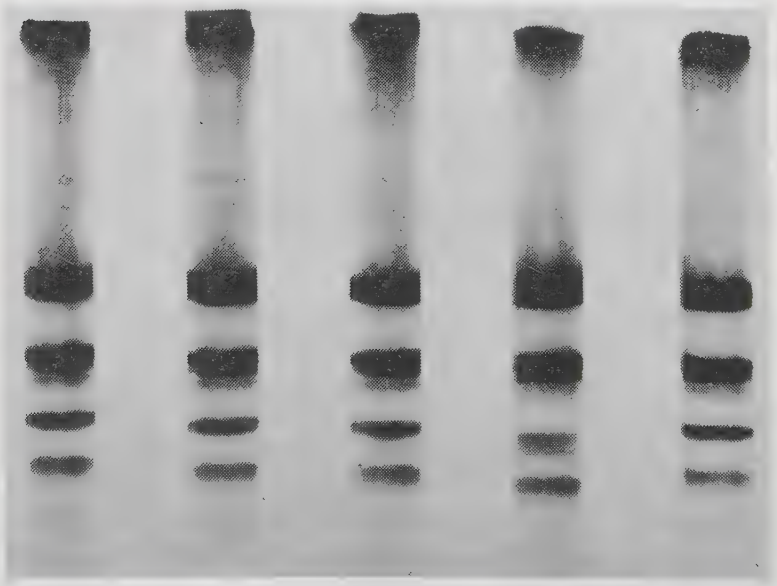


Abb. 9. Versuchsreihe mit Kaninchenmuskel. Aufgetragene Substanzmenge : Drei 40 μ-Schnitte.

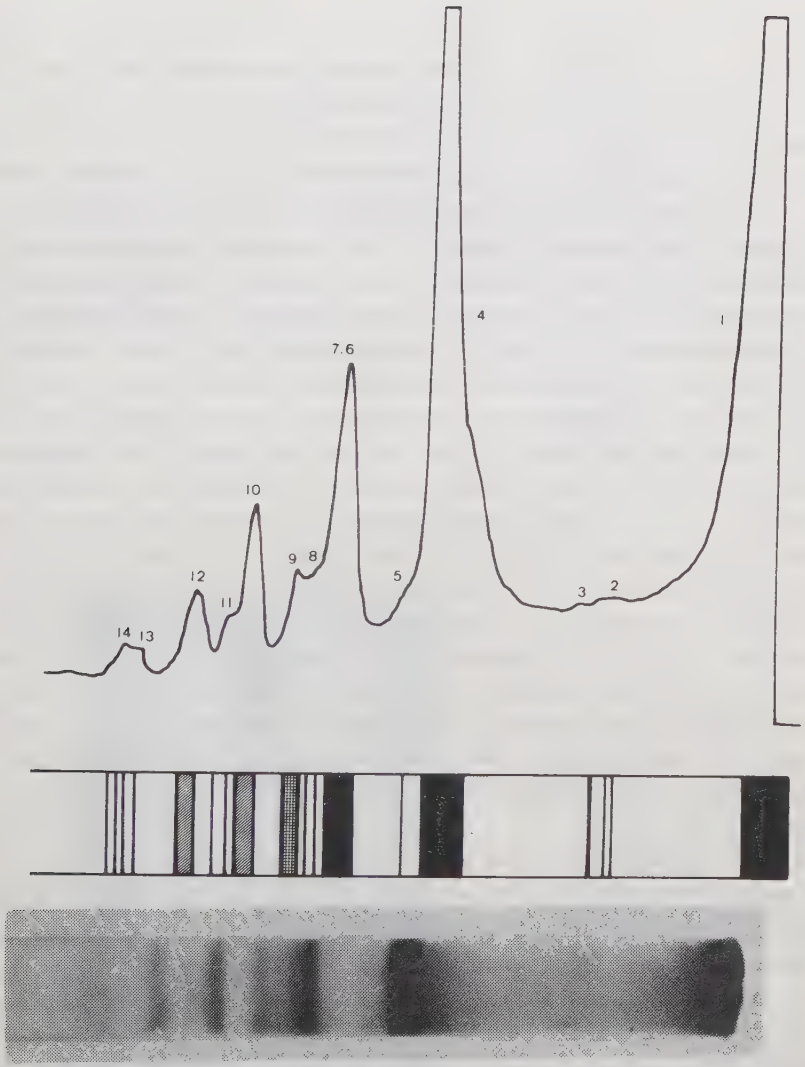


Abb. 10. Typische Proteinverteilung des Kaninchenmuskels nach elektrophoretischer Trennung, mit schematischer Darstellung der Fraktionen und densitometrischer Kurve.

II. Ratte:

Die Muskelstücke wurden wieder der Glutaealmuskulatur von mit Äther getöteten weißen Ratten entnommen.
Für die Elektrophorese gelangten erneut zwei 40 μ - Schnitte zur Auftrennung. Da die exzidierten Proben in ihren Größen etwas verschieden waren, und deswegen auch die Kryostatschnitte differierende Maße hatten, waren die untersuchten Proteinmengen von Versuch zu Versuch unterschiedlich. Einer exakten, quantitativen Auswertung und einer Aussage über eventuelle pathologische Veränderungen würde dies sehr im wege stehen. Auf dieses Problem soll deshalb später noch einmal eingegangen werden.
Bei den vorausgehenden Versuchen konnte eine, gegen Ende der Elektrophorese auftretende teilweise Verflüssigung des Sammelgels beobachtet werden, durch die manchmal ein mehr oder weniger starkes Absinken, oder eine Schrägstellung der vorher horizontal liegenden Schnitte hervorgerufen wurde. Nach Entfernung der Röhrchen ließ sich eine ziemlich starke Erwärmung dieses Abschnittes feststellen, während das Trenngelstück nur handwarm war, da es zum größten Teil in den unteren Elektrodenpuffer eintauchte, der bei Beginn der Elektrophorese Kühlschranktemperatur besaß. In einigen Fällen mußte auf diesen irregulären Versuchsverlauf die Tatsache zurückgeführt werden, daß die Proteinfraktionen nicht als Scheibchen, sondern als Segmente nur in einer Hälfte des Trenngels wanderten.
Aus diesem Grunde wurden bei einem Versuch unter Verzicht auf das gesamte großporige Gel die Schnitte unmittelbar auf die Trenngeloberfläche aufgebracht und anschließend, möglichst unter Vermeidung einer Aufwirbelung dieser Schicht die Röhrchen mit Elektrodenpuffer angefüllt. Das Muskelgewebe blieb so während der ganzen Elektrophorese in einer waagerechten Lage, die Ergebnisse der Trennung waren jedoch so wenig zufriedenstellend, daß dieser weg wieder verlassen werden mußte.
Statt dessen konnte durch eine geringe Verdünnung des Sammelgels eine Vermischung mit der Flüssigkeit, in der die Schnitte sich befanden, verhindert und eine von ihr scharf abgesetzte Polymerisationsgrenze erreicht werden. Ein Absinken der Proben trat

nach dieser Änderung nicht mehr auf, aber es schien, als ob darunter die Auftrennung in die feinen Fraktionen nachteilig beeinflußt würde. Die Versuchsreihen wurden zwar ohne weitere Modifikationen zu Ende geführt, doch bleibt zu überlegen, ob nicht eine zusätzliche Kühlung, wie sie in das Schema auf Seite 14 bereits eingezeichnet ist, eine Verbesserung der Resultate bringen könnte.

Die Elektrophorese des Rattenmuskels zeigte im Prinzip die gleichen Erscheinungen und ein ähnliches Proteinmuster wie beim Kaninchen. Die braune Fraktion, die sich nach der Anfärbung wieder als sehr unregelmäßig begrenzt erwies, war auch hier aufgetreten und stellte ein spezifisches Merkmal jeder Trennung dar. Im Vergleich zum Kaninchen kommt deutlich ein hauptsächlicher Unterschied im Proteincharakter der beiden Spezies zum Vorschein, nämlich die stet anwesende, kanincheneigene Bande 10/11 in Abb. 10, die bei der Ratte grundsätzlich fehlt. Ausserdem treten bei letzterer die Fraktionen in der oberen Hälfte des Gels stärker hervor.

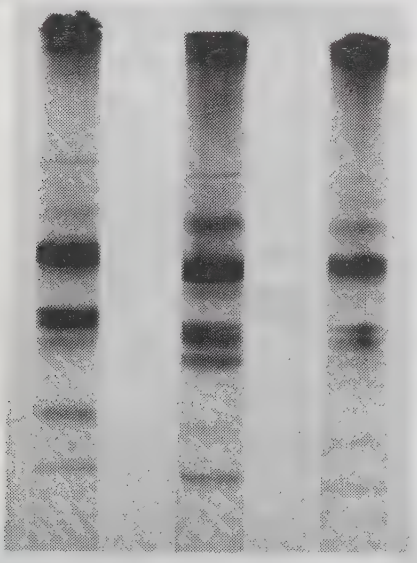


Abb. 11
Variationsmöglichkeiten in der Feinaufteilung von Proteinfraktionen der Ratte, dargestellt in drei Exemplaren verschiedener Versuchsreihen.

Die relativ starke Eiweißbande direkt über der gezackten Zone muß jedenfalls eindeutig als ebenso kennzeichnend für die Ratte, wie das Fehlen der oben genannten Fraktionen hervorgehoben werden, denn es ließ sich beim Kaninchen an dieser Stelle niemals eine

derart auffällige Proteinkonzentration nachweisen. Ob im Bereich der Gipfel 6 - 9 in Abb. 10 zum entsprechenden Abschnitt des Pherogramms der Ratte eine Abweichung besteht, kann nicht mit Sicherheit festgestellt werden, doch liegt auch hier die Vermutung nahe, daß bei der Ratte diese Zone vielfaltiger unterteilt ist. Die Abb. 11 zeigt allerdings, wie differierend gerade in diesem Gebiet die Auftrennung ist. In diesem Zusammenhang sei erwähnt, daß die am schnellsten wandernde Proteinsubstanz sowohl beim Kaninchen, der Ratte als auch beim Menschen sich häufig in zwei Unterfraktionen aufteilt, aus diesem Verhalten dürfen deshalb keine Rückschlüsse für eine bestimmte Spezifizierung gezogen werden. Weshalb diese Bande sich so unterschiedlich verhält und sich nicht immer auftrennt, ist unklar.

Um eine Vergleichsmöglichkeit zur Extraktelektrophorese zu erhalten, wurden zwei eingefrorene Muskelstücke der Ratte nachträglich mit verschiedenen Flüssigkeiten extrahiert, in einem Fall 0,5 g in 5 ml Na-EDTA, im anderen 1 g in 5 ml 0,2 m Boratpuffer mit einem pH-Wert von 8,3. Nach Homogenisierung mit dem " Ultraturrax" und anschliessender Zentrifugation bei 20.000 U/min erfolgte die Elektrophorese auf dieselbe weise wie die des Serums.

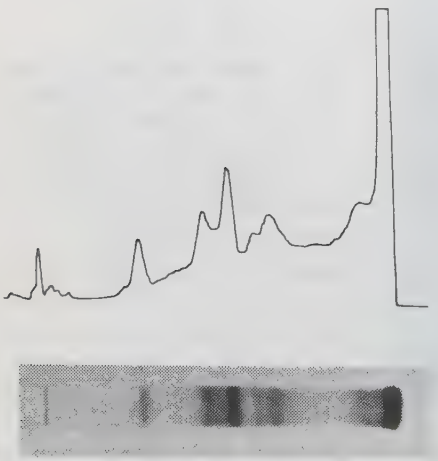


Abb. 12 Disc-Elektrophorese eines mit Boratpuffer pH 8,3 hergestellten Muskelextrakts.

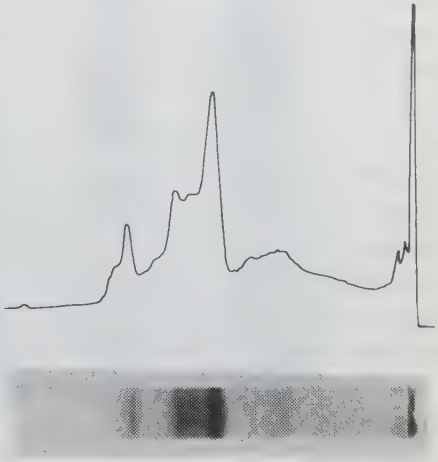


Abb. 13. Disc-Elektrophorese von mit Na-EDTA extrahierten Muskelproteinen.

In Abb. 12 und 13 sind die Ergebnisse festgehalten, die untereinander bis auf die Fraktion am Anfang des Gels ziemlich ähnlich sind, aber im Gegensatz zur Gewebselektrophorese ein etwas anderes Muster aufweisen.
Hier wird verdeutlicht, wie verschieden sich der Einfluß der Extraktionsmedien auf das Gesamtbild der elektrophoretischen Protein aufteilung auswirkt. Es dürfte aber auch der Nachweis erbracht sei daß die direkte Gewebselektrophorese mit der modifizierten Disc-Methode durchaus ebenbürtige, wenn nicht sogar verbesserte Auftrennungen zu erzielen vermag.
Im nachfolgenden Schema wurden wieder die Hauptgruppen der Ratten proteine mit allen Unterfraktionen, die sich in verschiedenen Versuchen ergaben, eingezeichnet. Abb. 15 zeigt ein typisches Serienbild und Abb. 16 die densitometrische Aufzeichnung eines Elektropherogramms.

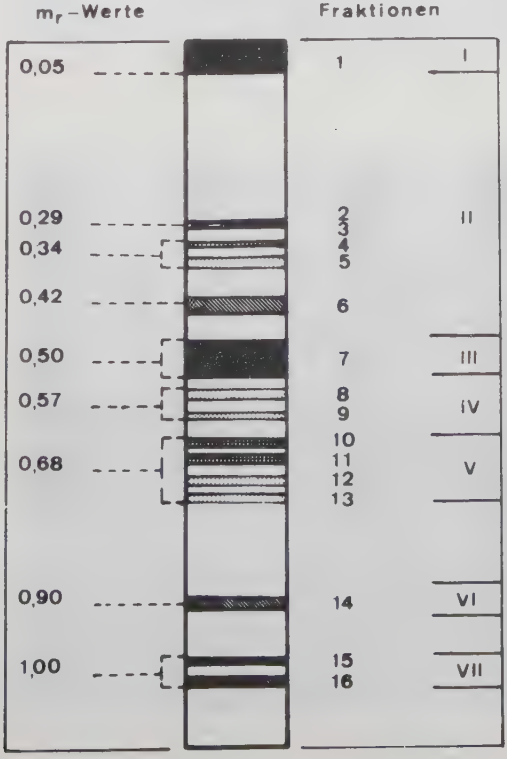


Abb. 14.
Schematische Darstellung der Prote infraktionen des Rattenmuskels.

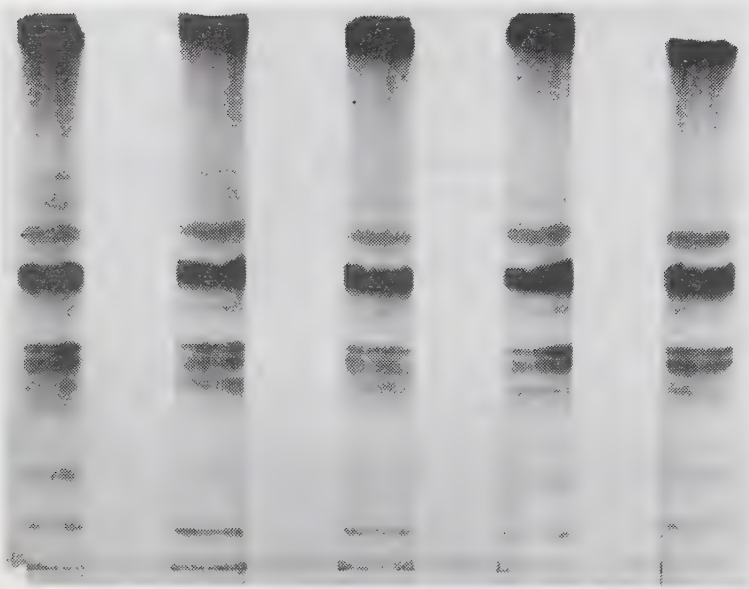


Abb. 15 a. Versuchsreihe mit Rattenmuskel.

Abb. 15 b. Versuchsreihe mit Rattenmuskel.

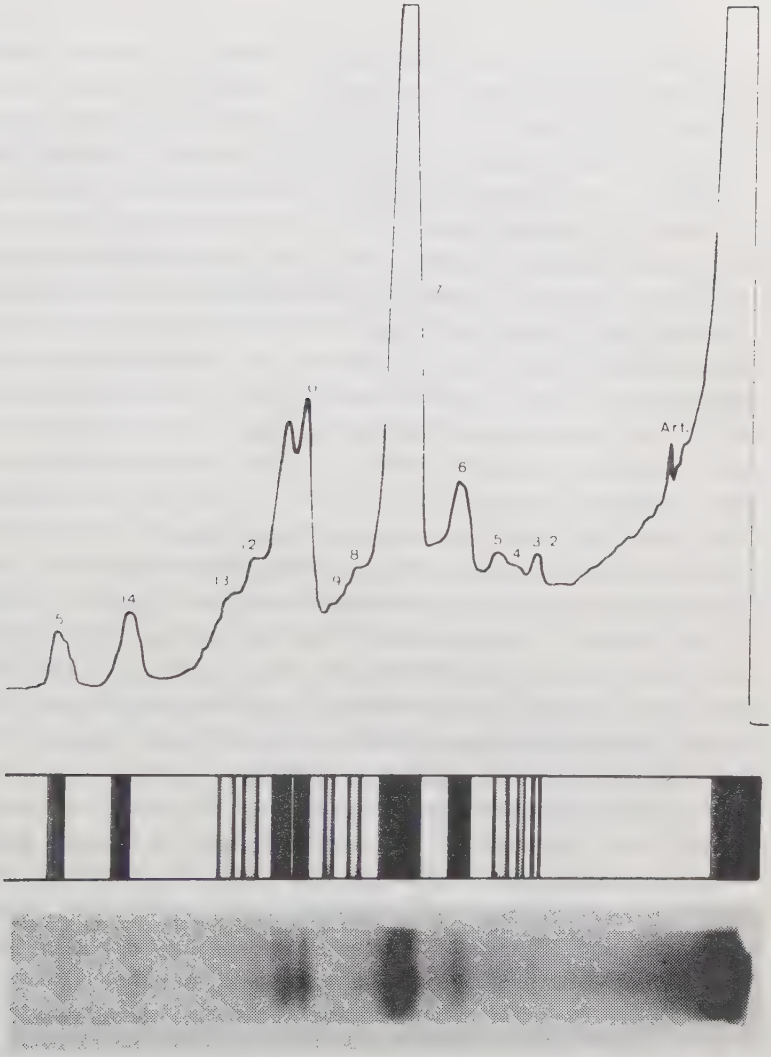


Abb. 16. Typisches Pherogramm eines Rattenmuskels, mit schematischer Darstellung der Fraktionen und densitometrischer Auswertung.

III. Mensch:

Das Gewebe, das untersucht wurde, stammte von zwei verschiedenen Patienten, welche beide keinerlei Anzeichen einer Muskelaffektion besaßen. In einem Fall handelte es sich um Operationsmaterial aus dem M. rectus abdominis (Serienbild 18 und Einzelbilder), im anderen um ein bioptisch erhaltenes Muskelstück aus dem M. tibialis anterior (Vergleichsserie Abb. 19). Es ließ sich nicht vermeiden, daß diesen Muskeln wesentlich mehr Blut beigemengt war, als denen der Kaninchen und Ratten. Dieser Umstand rief eine ausgeprägte Verstärkung der bräunlich-roten Schicht hervor, deren Wanderung ohne Schwierigkeit mit dem Auge verfolgt werden konnte. Die Zackung der oberen Seite erreichte diesmal in einigen Versuchen das Doppelte der sonstigen Ausmaße. Zweifellos muß die Ursache dieser Erscheinung mit dem vermehrten Hämoglobingehalt der Schnitte in Zusammenhang gebracht werden.
Wie schon bei den Tierversuchen ergab auch die Auftrennung der Muskelproteine des Menschen ein in den Grundzügen sich regelmäßig wiederholendes Bild. Wenn man das Pherogramm wieder in sieben Abschnitte unterteilt, dann befindet sich am Anfang jene Proteinansammlung, die höchstens 0,5 cm weit in das Gel eindringt. Es folgt ein Bereich mit einer Anzahl feiner Banden, die sich gegen eine immer vorhandene leichte Hintergrundsfärbung abheben. Das Präparat aus dem M. tibialis anterior läßt hier im Gegensatz zum M. rectus abdominis zwei bis drei dieser schwachen Fraktionen vermissen. Das mag darauf beruhen, daß die Qualität dieser Versuche, die naturgemäß nicht fortwährend gleich gut sein kann, in diesem Fall etwas schlechter war und die Darstellung jener Banden verhinderte. Andererseits wäre es möglich, aus der abweichenden Darstellung Unterschiede zwischen einzelnen Muskelgruppen abzuleiten. Es sind in der Literatur solche differierenden Proteinmuster bei Elektrophoresen mehrerer Muskeln einer Spezies angegeben worden, doch läßt sich ohne eine entsprechende Kontrollversuchsreihe bei unseren Ergebnissen keine definitive Aussage in dieser Beziehung machen.
An der nächsten Stelle des Einteilungsschemas steht die unregelmäßig begrenzte Proteinschicht, und anschließend kommen zwei Abschnitte, welche, wenn auch nicht unbedingt in der Position und

Anzahl der Banden, so doch in ihrer jeweiligen Konzentration kennzeichnend für die Elektrophorese der menschlichen Muskelproteine im Vergleich zu denen des Kaninchens und der Ratte sind. (Abb. 19 und 20). Der eine, etwa 0,5 cm von der gezackten Zone entfernte Teil dieser Gruppe von Proteinen besteht aus zwei nahe beieinanderliegenden, ziemlich gleich starken Banden, der andere, wiederum im Abstand von 0,5 cm, aus einer intensiv angefärbten und einer schwächeren Fraktion.
Im unteren Bereich des Gels zeigt sich im allgemeinen eine ähnliche Aufteilung wie beim Kaninchen und der Ratte. Der Gipfel 15 in Abb. 25 dürfte den Gipfeln 14 bzw. 12 in Abb. 16 bzw. Abb. 10 entsprechen. Beim Menschen befindet sich vor dieser Fraktion noch eine, die sehr schwach ist und sich teilweise fast nur erahnen läßt. Das Gegenstück dazu fehlte bei den beiden Tierarten, so daß es sich hier um eine arteigene Bande handeln könnte. Da sie jedoch so wenig ausgeprägt und oft gar nicht mehr zu erkennen ist, hat sie nur einen geringen Aussagewert.
Die am schnellsten wandernde Fraktion läßt auch diesmal wieder die gleiche unzuverlässige Auftrennung erkennen, wie sie schon bei den früheren Versuchen auftrat und beschrieben wurde.
Das Vergleichsbild 19 mit seiner Zusammenstellung der Kaninchen-, Ratten- und Menschenmuskelpherogramme ist das Ergebnis eines einzelnen Versuchs, in dem diese drei Muskeln gemeinsam einer elektrophoretischen Auftrennung unterworfen wurden. Es kann festgestellt werden, daß eine Zuordnung zu einer bestimmten Spezies nach ihrem Proteinmuster sehr gut möglich ist.
Eine entscheidende Frage bei jeder Elektrophorese ist die, inwieweit durch die Anwesenheit von Proteinen aus dem Blut bzw. Serum eine Abgrenzung muskeleigener Fraktionen erschwert und eine Beurteilung kompliziert wird. Deshalb wurde in Abb. 21 ein Normalserum der Auftrennung des Menschenmuskels gegenübergestellt. Aus der rein visuellen Abschätzung der beiden Proteinmuster kann mit einiger Sicherheit ein Teil der Fraktionen als muskelspezifisch erkannt werden. Eine eindeutige Verstärkung durch eine vermehrte Verunreinigung des Gewebes mit Blut trat bis jetzt auf jeden Fall bei der peroxydasepositiven Zone auf. In der Diskussion soll dieses Problem noch einmal aufgegriffen werden.

Eine Möglichkeit zur weiteren Identifizierung stellt die Untersuchung von gewissen Enzymmustern dar. Dieses Gebiet ist jedoch so umfangreich, daß hier nur der Anfang einer enzymatischen Charakterisierung gemacht werden konnte. Zu diesem Zweck brachte man einen Teil der Gele nach Abschluß der Elektrophorese in drei verschiedene Lösungen zum Nachweis folgender Enzyme:

1. Peroxydase
2. Lactatdehydrogenase (LDH)
3. Adenosintriphosphatase (ATP-ase)

Zum Vergleich dient in den Abb. 22 - 24 ein aus demselben Versuch stammendes Gel, das in der üblichen Weise mit Amidoschwarz angefärbt wurde.

1. Peroxydase
   Inkubationsmedium:
   50,0 ml gesättigte Benzidinlösung in 10 %iger Essigsäure
    0,1 ml 30 %iges Wasserstoffperoxyd

Innerhalb von 30 Sekunden trat eine intensive, grünblaue Anfärbung auf, die neben der stärksten Zone in der Mitte noch eine Anzahl weiterer peroxydasepositiver Fraktionen zum Vorschein brachte (Abb. 22). Die zwei fraktionsähnlichen Gebilde über der kräftigen mittleren Bande, und ebensolche Erscheinungen am Ende des Gels sind Zufallsprodukte, die sich nach längerem Aufbewahren ergeben haben.

2. Lactatdehydrogenase
   Inkubationsmedium:
   35 ml 0,05 m Trispuffer pH 7,4
    1 ml 2,14 m Natriumlactat
    3 ml 0,06 m KCN
   0,4 ml 0,2 %iges Phenazinmethosulfat
   19 mg TNBT (Tetranitroblautetrazoliumchlorid)
   25 mg DPN (Diphosphopyridinnucleotid)

Nach einer Inkubationszeit von 1 Stunde bei 38° C entwickelte sich ein Enzymmuster, das aus sieben deutlich voneinander abgegrenzten Bereichen besteht (Abb. 23). Das Auftreten einer starken enzymatischen Reaktion an Stellen des Pherogramms, wo bei normaler Proteinanfärbung keine Fraktionen zu sehen waren, ist nicht ungewöhnlich und wurde schon öfters beobachtet und beschrieben (4, 61).

3. Adenosintriphosphatase
   Inkubationsmedium:
   76 mg ATP
   10 ml 0,1 m Barbital-Natrium
   5 ml 0,18 m Calciumchlorid
   15 ml aq. dest.
   Einstellung auf pH 9,4 mit 1 n NaOH und Auffüllung mit aq. dest. auf 50 ml.

Nach einstündiger Inkubation bei 38° C wurde das Gel für 15 Minuten in 1 % iges Calciumchlorid gebracht und anschließend zur Färbung in 0,2 % iges Alizarin S, worin es eine Stunde verblieb. Den überschüssigen Farbstoff entfernte man durch wiederholtes Waschen in 7,5 % iger Essigsäure. Die Fraktionen, die auf diese Weise zur Darstellung kamen, zeigt die Abb. 24.
Für den menschlichen Muskel wurde versuchsweise die quantitative Auswertung der Kurven (Abb. 25) einer Serie unternommen, um den Grad der Übereinstimmung relativer Prozentzahlen bei den einzelnen Eiweißfraktionen zu ermitteln.

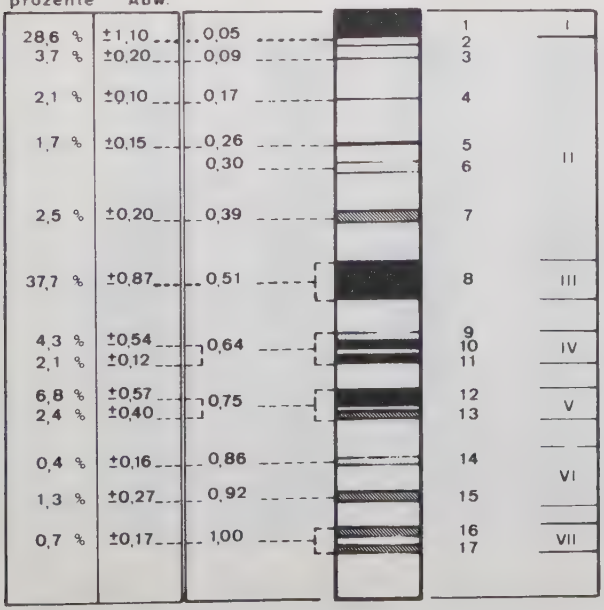


Abb. 17.
Schematische Darstellung der Proteinfraktionen des menschlichen Muskels mit Angabe der relativen Prozentzahlen.

Die Eintragung der Gauß'schen Verteilungskurven und ihre Planimetrierung schafft natürlich noch weitere Fehlerquellen, weshalb dem erhaltenen Resultat keine absolute Bedeutung beigemessen werden kann.
Im Schema sind die Relativprozente und deren mittlere Abweichung in die linke Spalte eingetragen.
Es ergab sich jedoch immerhin für die stärkeren Fraktionen nur eine mittlere Abweichung von 2,5 - 5 Prozent. Bei den schwächeren hingegen stieg dieser Betrag auf durchschnittlich 10, bei den Banden am Ende des Gels auf 25 oder mehr Prozent an. Man sieht, daß unter diesen Umständen noch auf wesentlich konstantere Versuchsbedingungen in einigen Punkten geachtet werden muß, bevor eine befriedigende, quantitative Aussage gemacht werden kann. Dies stellt jedoch keine Beeinträchtigung unserer Ergebnisse dar, da sich unsere Untersuchungen lediglich darauf beschränkten, die grundsätzliche Möglichkeit einer direkten, reproduzierbaren Gewebselektrophorese aufzuzeigen.

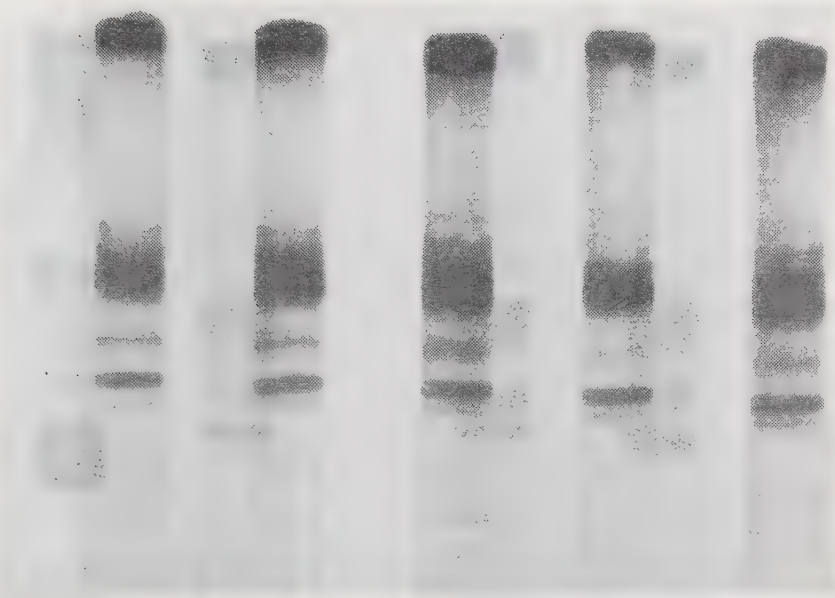


Abb. 18. Versuchsreihe mit menschlichem Muskel.

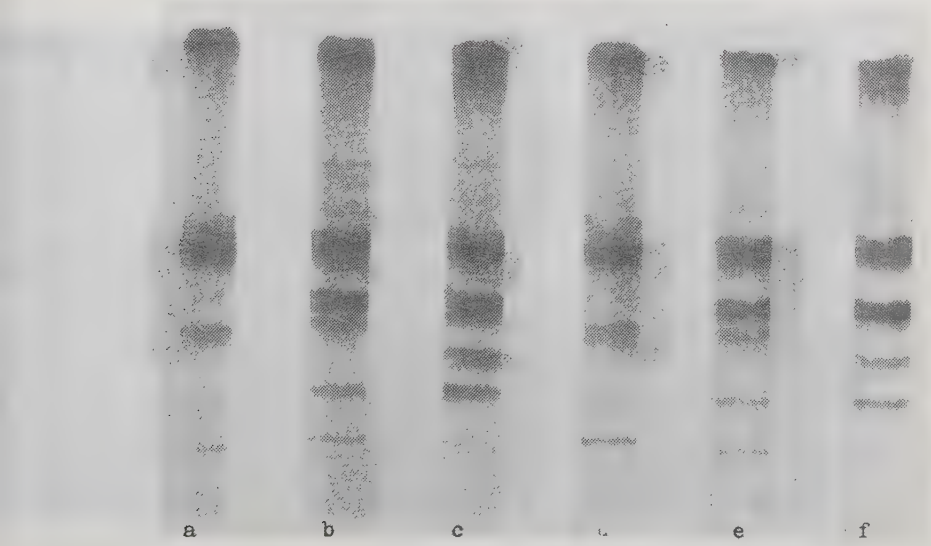


Abb. 19. Vergleichsserie: Mensch, Ratte und Kaninchen.
a u. d: Mensch; b u. e: Ratte; c u. f: Kaninchen

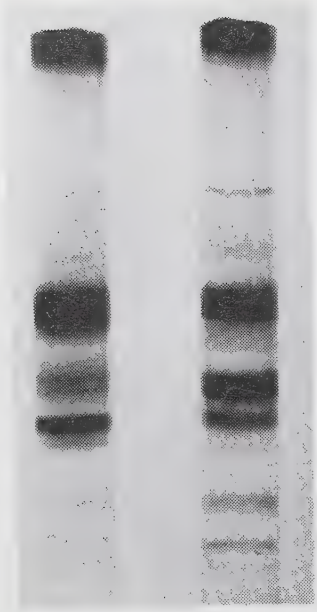


Abb. 20. Vergleichsbild
l.: Mensch r.: Ratte

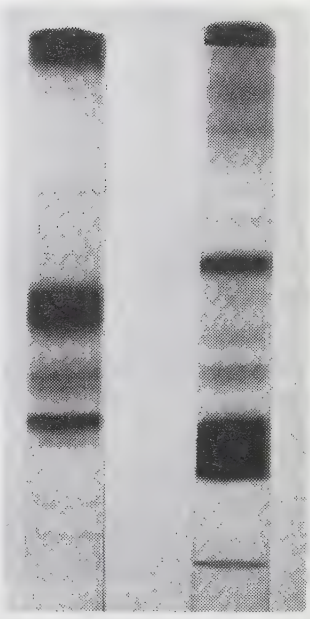
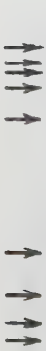
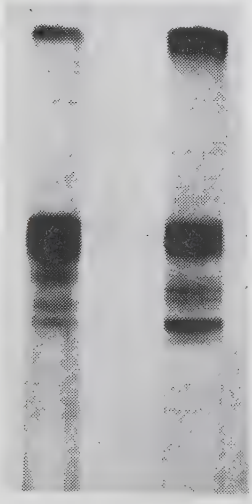
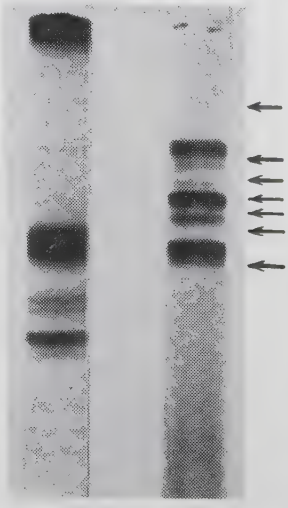


Abb. 21. Vergleichsbild
l.: Mensch r.: Serum







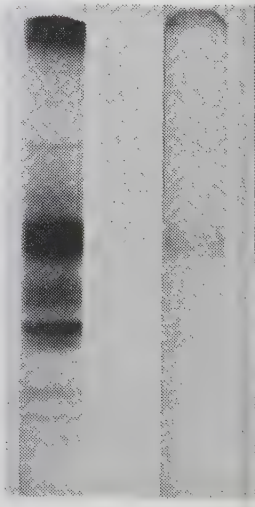


Abb. 22. Peroxydase Abb. 23. LDH Abb. 24. ATPase

(die enzymatischen Reaktionen traten nur an den mit Pfeilen bezeichneten Stellen auf, fraktionsähnliche Erscheinungen wie bei der Peroxydase sind Zufallsprodukte).

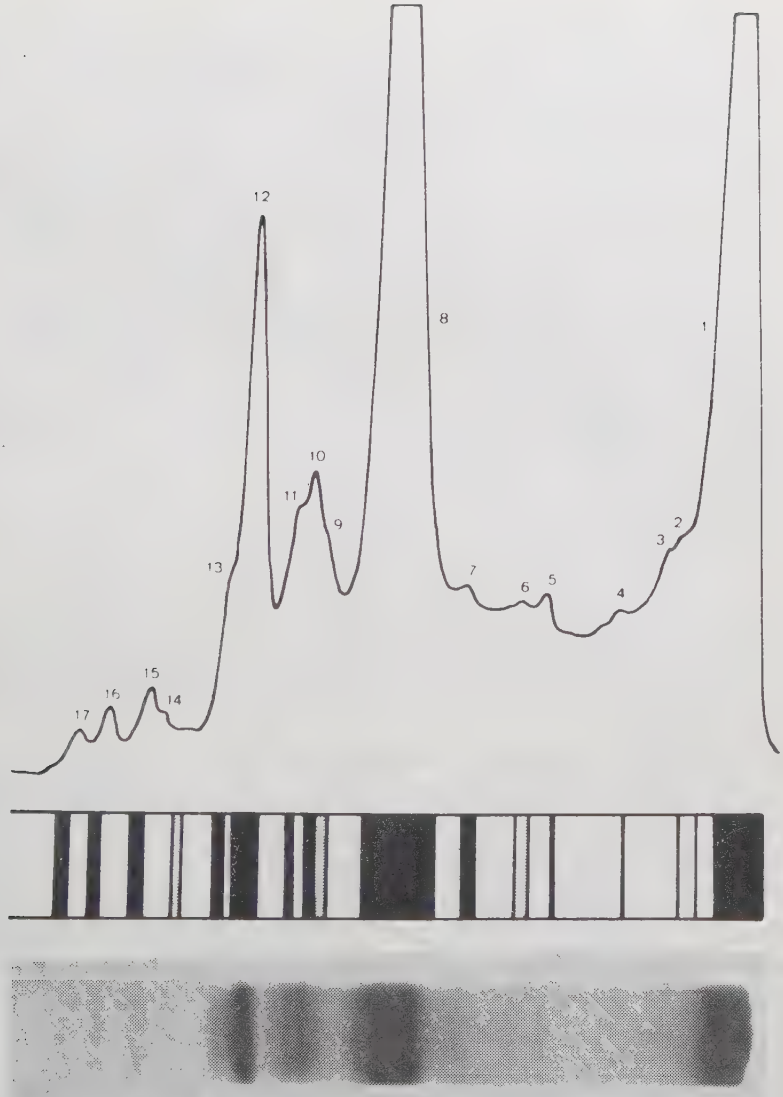


Abb. 25. Elektropherogramm des menschlichen Muskels. Schematische Darstellung der Fraktionen und densitometrische Auswertung.

DISKUSSION

Die direkte Gewebselektrophorese ist bis jetzt lediglich in einigen wenigen Fällen in der Literatur angegeben worden, und dann nur am Rande, da scheinbar die erzielten Ergebnisse deutlich von den Extraktelektrophoresen übertroffen wurden. WIEME (102) und DENIS (21) erwähnten die Möglichkeit der unmittelbaren Einbringung von bioptischem Gewebsmaterial in Agargel, diesbezügliche Hinweise für die Stärke- oder Polyacrylamidgelelektrophorese fehlen jedoch bis jetzt (STRICKLAND, 94, Mc DOUGALL, 60,). Die Verwendung von Kryostatschnitten zur Untersuchung von Gewebsproteinen verschiedener Herkunft wurde von KLEIN (55), FELGENHAUER (32), BLANCHAER (8) und MOREAU - COLLINET (65) erwähnt, in allen diesen Fällen benützte man die Schnitte aber nur zur Herstellung eines Extraktes, der durch Homogenisierung und Zentrifugation aus ihnen erhalten wurde. Von einer Vereinfachung und Abkürzung des Arbeitsvorganges kann somit nicht gesprochen werden. Der direkten Gewebselektrophorese am nächsten kommt die Methode von MATOLTSY (63), die der Vollständigkeit halber hier angeführt werden soll. Er bediente sich ebenfalls der Disc-Technik und brachte für seine Untersuchungen lyophilisiertes Gewebe als Pulver zwischen zwei Schichten von feinen Glasperlchen, die er mit in das großporige Gel einpolymerisierte.

Der Ausgangspunkt unserer Überlegungen war, mit den gegebenen Möglichkeiten eine schnelle und einfache elektrophoretische Trennung zu erreichen, die dennoch exakte und reproduzierbare Ergebnisse liefern sollte. Eine wesentliche Rolle spielte dabei die Forderung, daß das bioptische Material, das zur histochemischen Untersuchung entnommen wurde, auch noch für die Elektrophorese ausreichen mußte. Die Vorteile einer kombinierten histochemischen und elektrophoretischen Auswertung einer Muskelschicht von maximal 100 μ Dikke liegen klar auf der Hand. Die zweite Bedingung, die erfüllt sein sollte, war die Anwendbarkeit der Elektrophoresetechnik auch für die klinischen Routinebestimmungen. Der Zeit- und Arbeitsaufwand für das Ansetzen des Versuchs darf deshalb ein gewisses Maß nicht überschreiten, die Trenn- und Entfärbezeit muß möglichst kurz sein, und die erhaltenen Resultate sollen zur Dokumentation aufbewahrt und ausgewertet werden können.

Die Disc-Methode ist imstande, allen diesen Forderungen zu genügen. Seit ihrem Erscheinen und ihrer Anwendung sind eine ganze Anzahl von Modifikationsvorschlagen, sowohl zur Verbesserung der Ergebnisse, als auch zur Vereinfachung der Methodik gemacht worden. So empfahlen u. a. HJERTEN (45) und RAYMOND (79) zur Verkürzung der Versuchszeit das weglassen des großporigen Gels, wodurch das Ergebnis nicht negativ beeinflußt werden würde. Wie schon anfangs erwähnt (s. S. 12 und 28) machten wir davon jedoch aus gewissen Gründen keinen Gebrauch. NARAYAN (67) führte die Elektrophorese mit einem Gerät durch, in dem das Gel einen rechteckigen statt runden Querschnitt hatte und gab an, daß auf diese weise ebenfalls eine Vereinfachung des Arbeitsvorganges erreicht werden könnte. Massenversuche mit bis zu 72 Einzelbestimmungen in einer Elektrophorese sind von MATSON (64) beschrieben worden, und SCHWABE (88) konstruierte eine Entfärbevorrichtung, durch die die Entfärbezeit wesentlich reduziert wurde (s. S. 18) und eine Beurteilung der Gele in kürzester Zeit erlaubte.

Auch zur Erhöhung der Trennfähigkeit sind unter Umständen noch Änderungen möglich. Eine zusätzliche Kühlung war bereits erwogen worden und könnte ohne größere Schwierigkeiten mit eingebaut werden. Noch keine Erwähnung fanden bis jetzt die Variationsmöglichkeiten, die mit dem Polyacrylamidgel durchführbar sind. Durch Konzentrationsänderungen des Acrylamids kann eine verschiedene Porengröße des Gels im Bereich von 10 - 20 Å erreicht werden, weshalb die Verwendung von unterschiedlichen Konzentrationen einen Weg darstellt, die Einheitlichkeit von stärkeren Banden zu untersuchen und sie gegebenenfalls noch weiter aufzutrennen. VOS (98) u. a. führten Versuche in dieser Richtung durch und erhielten zum Teil bemerkenswerte Ergebnisse. Allerdings muß das Auftreten veränderter Proteinmuster berücksichtigt werden, die dann einen Vergleich wieder etwas schwierig gestalten. Neben der Variierung der Porengrößen des Gels besteht auch die Möglichkeit, verschiedene pH- und Puffersysteme einzuführen. Ein Versuch dieser Art nach REISFELD und WILLIAMS (103) brachte jedoch keine günstigeren Resultate. Es bliebe weiteren Nachforschungen vorbehalten, auf solche Weise verbesserte Auftrennungen der Muskelproteine zu erreichen.

kann man die ersten zwei Forderungen, nämlich geringer Untersuchungsmaterialbedarf und klinische Verwertbarkeit der Methode, als erfüllt betrachten, so ist das Problem einer Standardisierung besonders in Bezug auf die genaue Bestimmung der zur Auftragung gekommenen Proteinmenge noch nicht gelöst worden. Da die modifizierte Disc-Elektrophorese vor allem zur Erfassung pathologischer Veränderungen im Proteinbereich bei Muskelerkrankungen dienen soll, muß man, um eine quantitative Auswertung vornehmen zu können, da grundsätzlich in diesem Punkt eine einheitliche Regelung finden. Zu diesem Zweck kann die schon einmal angegebene Auftragung der Schnitte auf Filterpapier benutzt werden. Man legt dazu eine entsprechende Anzahl von Kryostatschnitten gleichmäßig übereinander, drückt darauf das mit Puffer getränkte Papier fest und entfernt anschließend die über den Rand der Scheibchen hinausragenden Gewebsanteile. Somit befindet sich auf den Blättchen eine bestimmbare, immer gleichbleibende Proteinmenge, die noch dazu den Vorteil einer überaus homogenen Verteilung besitzt, einer weiteren Voraussetzung für eine optimale Elektrophorese. Das Material aus dem die Blättchen bestehen wird am besten so gewählt, daß möglichst keine Adsorption der Proteine auftritt. Wie die Abb. 5 zeigte, entstehen durch diese Art der Substanzauftragung etwas abweichende Proteinmuster, weshalb Kontrollversuche erst nach Aufschluß über ein normales Pherogramm bringen müßten.
Abschließend kann zur Methodik gesagt werden, daß sie die Möglichkeit bietet, auch im klinischen Bereich eine schnelle, einfache und genaue Elektrophorese von Gewebsproteinen durchzuführen.

Seit der Einführung in die wissenschaftliche Forschung fand die Elektrophorese in ihren zahlreichen Formen auch verbreitete Anwendung für die Proteinaufklärung des Muskelgewebes. Besonders umfangreiche Untersuchungen wurden mit der ursprünglichen Anordnung nach TISELIUS angestellt. So trennten der Arbeitskreis um DUBUISSON (27, 28), JAKOB (48) und CREPAX (17, 18), sowie BOSCH (9), HAAN (41), SANTAMARIA (80), DERVILLÉE (23, 24), KEELER (52), AMBERSON (2), JAMMAERS (19), u. a., die bei niedriger oder höherer Ionenstärke löslichen Muskelproteine des Menschen und der verschiedensten Tierarten.
Nach der Klassifikation von JAKOB, die weitgehend von den anderen

Autoren übernommen wurde, teilte man die erhaltenen Eiweißfraktionen in die sog. Myoalbumine, Myogene und das Myosin bzw. das Aktomyosin ein.
Papierelektrophoretische Auftrennungen, ausgeführt von HETENYI (14), WOLLENBERGER (104), SANTAMARIA (85), BISTOCCHI (7), und Versuche mit Agargel von BAUER (6), GYSELS (40), WIEME (100, 101), AMBROSINO (3) und LOWENTHAL (59) zeigten ein relativ ähnliches Bild in der Proteinzusammensetzung des Muskelextraktes. Die Nomenklatur der freien Elektrophorese wurde deshalb in einigen Fällen auch hier benützt.
Etwas schwieriger gestaltete sich die Identifizierung der Banden dann, als die Stärkeelektrophorese mit in die Untersuchungen einbezogen wurde. Von der großen Anzahl der veröffentlichten Arbeiten seien an dieser Stelle nur die von HUGHES (46), LAURENT (56 SANTAMARIA (85), HARTSHORNE (43), DENUCE (22) und NEELIN (68) erwähnt. Die durch den Molekülsiebeffekt zusätzlich erreichte Auftrennung schuf ein vielfältiges Proteinmuster, mit zum Teil feinsten Banden, das die Einteilung nach den einfachen elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeiten unmöglich machte. Die Ergebnisse, die man mit dem Polyacrylamidgel als Trägermedium erhielt, müssen von demselben Gesichtspunkt aus betrachtet werden und erlauben am ehesten noch den Vergleich mit den Stärkegelelektrophoresen.
Für die Serumproteine konnte durch Trennungen der einzelnen Filterpapierfraktionen im Stärkegel das alte Schema der α -, β -, γ - Globuline und Albumine auf das neue System übertragen werden (SMITHIES 74), und von hier wiederum auf die Resultate der Polyacrylamidversuche. Die Lokalisation einiger Fraktionengruppen ergibt im Vergleich zur Papierelektrophorese ein völlig abweichendes Bild Es ist deshalb nicht verwunderlich, wenn man sich gerade bei den von vornherein noch wenig untersuchten Muskelproteinen vorerst mit einer beschreibenden Einteilung begnügen muß. Durch die Angabe von m_r-werten kann hier wenigstens eine Zahlenmäßige Relation der Fraktionen zueinander festgehalten werden, und größtenteils beschränkte man sich in den bisher erschienenen Publikationen auf diese schematische Klassifizierung. Selbstverständlich sind immer die

jeweiligen Versuchsbedingungen zu berücksichtigen, bevor man einen Vergleich mit Ergebnissen anderer Autoren anstellen kann. Die Ionenstärke (bei unserer Anordnung ist für Sammel- und Trenngel $\mu = 0{,}04$), die Puffersubstanz und der pH- wert sind dabei von entscheidender Bedeutung. Wie unterschiedlich das Bild bei Verwendung verschiedener Puffer sein kann, erwiesen die Stärkegelversuche, die HUGHES (46) und ECOBICHON (29) u. a. in diesem Zusammenhang ausgeführt haben. Besonders mit TRIS-HCL und TRIS-Borsäurepuffer stellte HUGHES eine offensichtliche Vermehrung der Fraktionen speziell im kathodischen Bereich fest. Er vermutete eine positive Abhängigkeit von der Natur des Pufferanions, in diesem Fall des Trishydroxymethylaminomethans. Die von uns unternommenen Stärkegelelektrophoresen ergaben ebenfalls regelmäßig einige kathodisch laufende Banden (Abb. 3), während eine diesbezügliche Kontrolle bei der Disc-Methode eine durchwegs anodische Wanderung der Proteine erkennen ließ. Dies mag zum großen Teil auf der fast fehlenden Elektroosmose im Polyacrylamidgel beruhen, wobei sicherlich die am Anfang des Gels liegengebliebene, bzw. überhaupt nicht in das Trenngel eingedrungene Eiweißmenge eine Anzahl von Fraktionen enthält, die im Stärkegel auf der Kathodenseite auftauchen. Methodische Änderungen, wie sie im ersten Teil der Diskussion beschrieben wurden, können hier weitere Einzelheiten zum Vorschein bringen.

Für die eingehendere Untersuchung der getrennten Proteinbestandteile stehen mehrere Möglichkeiten zur Verfügung. So kann schon während der Elektrophorese selber auf das Vorhandensein von bräunlich gefärbten Banden geachtet werden, die auf Hämoglobin bzw. Myoglobin schließen lassen. Nach Abschluß der Trennung bieten die einzelnen histochemischen Nachweisreaktionen zur Darstellung von Lipiden, Kohlehydraten, Aldehydgruppen, Nukleinsäuren und einigen anderen Verbindungen einen breitgespannten Rahmen für gezielte Identifizierungen. Hinzu kommen die enzymatischen Bestimmungen, die, wenn sie auf dem Prinzip einer Farbstoffreaktion beruhen, ohne Schwierigkeit durchzuführen sind. Vorteilhaft wirkt sich dabei die Tatsache aus, daß in den Lösungen, die für die Gefrierschnitte gebraucht werden auch die Inkubation der Polyacrylamid-

gele erfolgen, und so in einem Arbeitsgang eine gleichzeitige enzymatische Untersuchung der Gele und der Schnitte vorgenommen werden kann. Neben den von uns nachgewiesenen Peroxydase-, Lactatdehydrogenase- und Adenosintriphosphataseaktivitäten wurden noch einige andere Enzyme im Polyacrylamidgel bestimmt, allerdings nicht bei Muskelproteinelektrophoresen (ALLEN (1), BARKA (5), KEYSER (54)).

Der Lactatdehydrogenase muß für die Muskelpathologie eine besondere Bedeutung beigemessen werden, da in der Literatur übereinstimmend eine Abnahme der LDH-4 und LDH-5 Isozyme (jedoch nicht unbedingt spezifisch für eine bestimmte Muskelerkrankung) beschrieben wurde (LAURYSSENS (57), BLANCHAER (8), BRODY (10), EMERY (30, 31), WIEME (100, 101) und BAKER (4)). In diesem Zusammenhang ist von Interesse, daß unsere enzymatischen Nachweise statt der üblichen fünf Isozyme eine grössere Anzahl von LDH-positiven Banden erkennen ließen. Zwar wurde von BAKER im Stärkegel ebenfalls eine Vermehrung der LDH-Fraktionen gefunden, doch erschwert diese zusätzliche Aufteilung die Übersicht über die Hauptgruppen, so daß erst Untersuchungen an pathologischem Material die Zugehörigkeit der von uns erhaltenen sieben Fraktionen zu den fünf Grundisozymarten klären können. Eine Aufspaltung durch Alterung des bioptischen Gewebes, wie sie von BRODY und VESELL (97) beobachtet wurde, scheidet aus, da das Muskelstück des Rectus abdominis vor der Elektrophorese nicht länger als acht Tage aufbewahrt wurde.

Zur Darstellung der Adenosintriphosphatase wurde von uns als Farbstoffreagens das Alizarin S benützt, nachdem das in der Histochemie zur Anwendung kommende Ammoniumsulfid nur eine diffuse Schwarzfärbung der Gele verursachte, in der sich keine Fraktionen mehr erkennen ließen. In welchem Ausmaß sich durch den modifizierten Reaktionsverlauf die Spezifität für den ATP-asenachweis unter Umständen verändert hat, konnte ohne eine Vergleichsmöglichkeit mit der üblichen Methode nicht festgestellt werden.

Schließlich seien mit der präparativen und der Immunelektrophorese noch zwei Identifikationsmöglichkeiten genannt, die sehr genaue Aufschlüsse über die Proteinzusammensetzung des Muskelgewebes erlauben, jedoch in der Durchführung etwas aufwendig und zeit-

raubend sind. Es hat sich erwiesen, daß die Disc-Elektrophorese Untersuchungen dieser Art ebenso gut wie andere Verfahren gestattet. Im Hinblick auf die Erkennung serumeigener Fraktionen können besonders immunophoretische Vergleiche eine klarere Unterscheidung bringen. BAUER und Mitarbeiter (6) unternahmen in dieser Beziehung Versuche mit Agargel und konnten einige Präcipitationslinien auf die Anwesenheit von Serumproteinen zurückführen. Allerdings kamen sie ebenso wie HAAN, HARTSHORNE, HUGHES und LÖWENTHAL zu dem Ergebnis, daß kleinere Serum- bzw. Blutbeimengungen keine kritischen Fehlerquellen bezüglich der Mobilität und Verteilung gewebsspezifischer Fraktionen darstellen. Nach HARTSHORNE beträgt der extrazelluläre Serumgehalt des Sarkoplasmas bei vorher nicht perfundierten Tieren immerhin noch etwa 10 - 15 Prozent des Gesamtproteinanteils.
Für unsere Versuche kann in dieser Richtung, abgesehen von einer rein visuellen Betrachtung, keine nähere Differenzierung getroffen werden; wenn unter Umständen von Muskelgewebselektrophoresen im Stärkegel durch HARTSHORNE und HUGHES Rückschlüsse auf die modifizierte Disc-Elektrophorese möglich sind, dann läßt sich lediglich sagen, daß die in Abb. 5 getrennte, unregelmäßig begrenzte Fraktion im langsam wandernden Anteil das Hämoglobin und im schneller wandernden das Myoglobin enthält.

Die hier angeführten Überlegungen verdeutlichen, welche Probleme trotz feststehender Methodik noch einer Klärung bedürfen, um die direkte Gewebselektrophorese zu einem brauchbaren diagnostischen Hilfsmittel in der klinischen Untersuchung werden zu lassen.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Es wurde eine Modifikation der Disc-Elektrophorese auf ihre Möglichkeiten für eine direkte Auftrennung von Muskelgewebe untersucht. Zwei bis drei 40 μ dicke Gefrierschnitte eines bei -20° C aufbewahrten Muskelstückes wurden unter Umgehung einer Extraktherstellung unmittelbar in das Polyacrylamidgel eingebracht. Das von DAVIS und ORNSTEIN übernommene System erwies sich als sehr geeignet für unsere Versuche, da seine unbestrittenen qualitativen Vorteile durch die einfache methodische Anordnung auch für die direkte Gewebselektrophorese ausgenützt werden konnten. In Anbetracht der nicht zu vermeidenden Unregelmäßigkeiten im Elektrophoresemilieu durch die Einführung der Schnitte, ergaben sich bei Konstanthaltung der Versuchsbedingungen ausgezeichnete und reproduzierbare Ergebnisse.
2. Als Untersuchungsmaterial fanden Muskelstücke von mit Äther getöteten Kaninchen und Ratten, sowie zwei bioptisch bzw. operativ erhaltene Proben menschlicher Muskulatur Verwendung. Nach ihrem elektrophoretischen Verhalten kann eindeutig jeder Spezies ein charakteristisches, arteigenes Proteinmuster zugeschrieben werden, wobei jedoch geringfügige Unterschiede im Bild der Pherogramme einzelner Exemplare derselben Art immer berücksichtigt werden müssen. Mit der modifizierten Disc-Elektrophorese konnten beim Kaninchen bis zu 15, bei der Ratte 16 und beim Menschen 17 Fraktionen ermittelt werden. Trotz wesentlicher Abweichungen untereinander erlaubte die Proteinverteilung bei den drei untersuchten Spezies doch eine allgemeine Einteilung in sieben Hauptbereiche, die man klar voneinander trennen kann.
3. Die Schwierigkeiten, die vor einer Anwendung der direkten Gewebselektrophorese zur Untersuchung von bioptisch gewonnenem, pathologisch veränderten Material noch überwunden werden müssen, wurden eingehend diskutiert. Für eine quantitative Auswertung der Ergebnisse scheinen einige methodische Änderungen angebracht zu sein. Das Problem einer Identifizierung der Eiweißfraktionen kann nur unter Zuhilfenahme enzymatischer, immunophoretischer und präparativer Methoden gelöst werden. Die Bestimmung der Peroxydase, Lactatdehydrogenase und Adenosintriphosphatase stellt einen ersten Schritt in dieser Richtung dar.

LITERATURVERZEICHNIS

1. ALLEN, J. M. The Properties of Golgi- Associated Nucleoside Diphosphatase and Thiamine Pyrophosphatase. II. Electrophoretic Separation and Identification.
   J. Histochem. Cytochem. 11, 542, (1963).

2. AMBERSON, W. R., ERDÖS, T., CHINN, B., LUDES, H. Electrophoretic and Ultracentrifugal Analyses of Protein Extracted from Whole Mammalian Muscles.
   J. Biol. Chem. 181, 405, (1949).

3. AMBROSINO, C., CALCIATI, A. et al. Ricerche elettroforetiche in gel di agar sulle proteine di muscolo umano normale liscio e striato.
   Minerva Med. 53, 1664, (1962).
   Ricerche elettroforetiche su di agar sulle proteine di muscolo striato umano in varie fasi di dermatomiosite.
   Minerva Med. 53, 2391, (1962).

4. BAKER, C. M. A. Species, Tissue and Individual Specifity of Low Ionic Strength Extracts of Avian Muscle and other Organs Revealed by Starch Gel Electrophoresis.
   Canad. J. Biochem. 44, 853, (1966).

5. BARKA, T. Studies of Acid Phosphatase. I. Electrophoretic Separation of Acid Phosphatases of Rat Liver on Polyacrylamid Gels.
   J. Histochem. Cytochem. 9, 542, (1962).

6. BAUER, H., GLOTZNER, F., SCHWARZE, I., SCHMALBACH, K. Elektrophoretische und immunoelektrophoretische Studien über Muskelproteine.
   Klin. Wochenschr. 42, 1198, (1964).

7. BISTOCCHI, M. Elettroforesi su carta delle proteine strutturali di muscolo di pesce.
   Arch. Sci. Biol. 45, 53, (1961).

8. BLANCHAER, M. C., VAN WIJHE, M. Isozymes of Lactic Dehydrogenase in Skeletal Muscle.
   Amer. J. Physiol. 202, 827, (1962).

9. BOSCH, M. W. Quantitative Electrophoretic Study of Rabbit Muscle Proteins Soluble in Dilute Salt Solutions.
   Bioch. Biophys. Acta 7, 61, (1951).

10. BRODY, I. A. Isozyme Histochemistry: A New Method for the Display of Selective Lactic Dehydrogenase Isozymes on An Electrophoretic Pattern
Nature 201, 685, (1964).

11. BROOME, J. A Rapid Method of Disc-Electrophoresis.
Nature 199, 179, (1963).

12. BURNS, D. A. Permanent Record and Scanning of Disc-Electrophoretic Patterns.
J. Chromat. 11, 559, (1963).

13. CAAN, J. R., GOAD, W. B. Precautions Required in Interpretation of Moving Boundary and Zone Electrophoretic Patterns.
Arch. Bioch. Biophys. 108, 171, (1964).

14. CARSTEN, M. E., MOMMAERTS, W. F. A Study of Actin by Means of Starch Gel Electrophoresis.
Biochemistry (Wash.) 2, 28, (1963).

15. CHARPENTER, J., GOUTEFONGEA, R. Electrophoretic Characteristics of Lactic Dehydrogenase in Normal and Exudative Pig Muscle.
Nature 201, 1325, (1964).

16. CLARKE, J. T. Simplified " Disc " (Polyacrylamid Gel) Electrophoresis.
Ann. N. Y. Acad. Sci. 121, 428, (1964).

17. CREPAX, P. Influence de l'énervation sur la composition des extraits protidiques des muscles striés.
Experentia 5, 167, (1949).
Etude électrophorétique d'extraits de muscles doués de différentes propriétés morphologiques et fonctionelles.
Experentia 9, 385, (1952).

18. CREPAX, P., JAKOB, J., SELDESLACHTS, J. Contribution à l'étude des protéinogrammes électrophorétiques d'extraits de muscles contracturés.
Bioch. Biophys. Acta 4, 410, (1950).

19. DAVIS, B. J. Disc Electrophoresis II. Method and Application to Human Serum Proteins.
Ann. N. Y. Acad. Sci. 121, 404, (1964).

20. DEBRAY-SACHS, M. Technique d'électrophorèse en gel d'amidon de broyats de tissus. Son application à l'analyse de fragments de tissu rénal prélèves par ponction biopsie.
Rev. Franc. Etudes Clin. et Biol. 8, 1047, (1963).

21. DENIS, L. D., et al.
A Microelectrophoresis Technique.
Yama 178, 1093, (1961).

22. DEMUCE, J. M. Studies on Experimental Nephrosis in Rats. I. Starch Gel Electrophoresis of Serum and Muscle Proteins Including Esterases.
Clin. Chim. Acta 7, 82, (1962).

23. DERVILLEE, E., RIGOT, R.
Étude électrophorétique du muscle squeletique en médicine légale.
Ann. méd. lég. 43, 73, (1963).

24. DERVILLEE, E., BRUNET-ANTIGNY, B.
Étude électrophorétique des protéines musculaires en médicine légale.
Ann. méd. lég. 44, 555, (1964).

25. DREYFUS, J. C., SCHAPIRA, G.
Électrophorèse en gel d'amidon des protéines musculaires solubles en milieu de faible force ionique (souris normales et myopathiques rats normaux et atrophiés, Hommes).
J. Physiol. Path. gén. 51, 453, (1958).

26. DREYFUS, J. C., DEMOS, J., SCHAPIRA, F.
La lacticodeshydrogénase musculaire chez le myopathe: persistance apparente du type foetal.
C. R. Acad. Sci. (Paris) 254,4384, (1962).

27. DUBUISSON, M. Differenciation électrophorétique de myosines dans les muscles au repos et fatigués de mammifères et de mollusques.
Experentia 2, 258, (1946).

28. DUBUISSON, M., JAKOB, J.
Électrophorèse de protéines musculaires.
Experentia 1, 272, (1945).

29. ECOBICHON, D. J., KALOW, W.
Properties and Classification of the Soluble Esterases of Human Skeletal and Smooth Muscle.
Canad. J. Biochem. 43, 73, (1965).

30. EMERY, A. E. Electrophoretic Pattern of Lactic Dehydrogenase in Carriers and Patients with Duchenne Muscular Dystrophy.
Nature 201, 1044, (1964).

31. EMERY, A. E., et al.
Electrophoretic Pattern of Muscle Lactic Dehydrogenase in Various Diseases.
Arch. Neurol. (Chicago) 12, 251, (1965).

32. FELGENHAUER, K. Microelectrophoresis on Polyacrylamide Gel.
Bioch. Biophys. Acta 133, 165, (1967).

33. FERRIS, Th. G., EASTERLING, R. E., BUDD, R. E.
Densitometer for Quantitation of Stained Protein Fractions Separated by Electrophoresis on Acrylamide Gels.
Analyt. Chem. 36, 955, (1964).

34. GILES, B.G.
Species Differences Observed in the Sarcoplasmic Proteins of Mammalian Muscle.
J. Sci. Food Agric. 13, 264, (1962).

35. GRABAR, P., WILLIAMS, C. A.
Méthode permettant l'étude conjuguée des propriétés électrophorétiques et immunochimiques d'un mélange de protéines.
Bioch. Biophys. Acta 10, 193, (1963).

36. GRAN, R., LEE, F. A.
Über den Einfluß der Temperatur auf das Verhalten der Eiweißstoffe des Rindersarkoplasmas.
Naturwissenschaften 50, 379, (1963).

37. GRASSMANN, W., HANNIG, K., KNEDEL, M.
Über ein Verfahren zur elektrophoretischen Bestimmung der Serumproteine auf Filtrierpapier.
Dtsch. Med. Wschr. 76, 333, (1951).

38. GROSSBACH, V.
Acrylamide Gel Electrophoresis in Capillary Columns.
Bioch. Biophys. Acta 107, 180, (1965).

39. DE GROUCHY, J.
Protéines et enzymes tissulaires. Une étude par électrophorèse en gel d'amidon.
Rev. Franc. Etudes Clin. et Biol.
5, 286, (1960).

40. GYSELS, H.
New Biochemical Techniques Applied to Avian Systematics.
Experentia 19, 107, (1963).

41. HAAN, H., et al.
Electrophoresis of the Non-Structural Proteins from Normal and Atrophic Muscles of the Rabbit and of Man.
Bioch. Biophys. Acta 11, 258, (1953).

42. HANSL, R.
Review of Some New Applications for Disc-Electrophoresis and of the Criteria for Quantitative Densitometry.
Ann. N. Y. Acad. Sci. 121, 391, (1964).

43. HARTSHORNE, D. J., PERRY, S. V.
A Chromatographic and Electrophoretic Study of Sarcoplasm from Adult- and Foetal-Rabbit Muscle.
Bioch. J. 85, 171, (1962).

44. HETENYI, E., Papierelektrophoretische Untersuchung der Eiweiße von normalen und atrophischen Muskeln.
Acta Physiol. Acad. Sci. Hung.
10, 421, (1956).

45. HJERTEN, S., et al.
Electrophoretic Particle Sieving in Polyacrylamide Gel as Applied to Ribosomes. Some Aspects of the Use of Continuous Buffer Systems in Polyacrylamide Gel Electrophoresis.
Analyt. Bioch. 11, 211, (1965).

46. HUGHES, B. P. The Electrophoresis of Some Human Muscle Proteins on Starch Gel.
Bioch. Biophys. Res. Comm.
1, 194, (1959).
Effect of Degeneration on the Albumin Components of Human muscle Extracts.
Nature 188, 1028, (1960).
Studies on the Starch Gel Electrophoresis of some Human Muscle Proteins.
Clin. Chim. Acta 6, 794, (1961).

47. HYDEN, H., BJURSTAM, K., Mc EWEN, B.
Protein Separation at the Cellular Level by Micro Disc Electrophoresis.
Analyt. Bioch. 17, 1, (1966).

48. JACOB, J. J. C. Electrophoretic Analysis of Protein Extracts from Striated Muscle.
Bioch. J. 41, 83, (1947).

49. JAMMARS, C. Analyse électrophorétique en phase liquide de extraits musculaires de l'unau.
Arch. Internat. Physiol. Bioch.
71, 773, (1963).

50. KAPLAN, N. O., CAHN, R. D.
Lactic Dehydrogenases and Muscular Dystrophy in the Chicken.
Proc. N. A. S. 48, 2123, (1962).

51. KATZ, A. M., KALOW, W.
Electrophoretic Characterization of Human Dehydrogenases.
Canad. J. Bioch. 43, 1653, (1965).

52. KEELER, R. F., YOUNG, S.
An Electrophoretic Analysis of Protein Extracts from Normal and Dystrophic Ovine Muscle.
Bioch. J. 81, 93, (1961).
Electrophoretic and Histological Evidence fo Muscle Regeneration in Ovine Muscular Dystro

phy.

Nature 193, 338, (1962).

53. KENDALL, J., WHITE, J. F.
The Separation of Rare Earths by the Ionic Migration Method.

Proc. Nat. Acad. Sci.
11, 393, (1925).

54. KEYSER, J. W. Staining of Serum Glycoproteins after Electrophoretic Separation in Acrylamide Gels.

Analyt. Bioch. 9, 294, (1964).

55. KLEIN, V., DRUBE, H., et al.
Elektrophoretische Charakterisierung in multiplen Formen vorkommender Enzyme der Magen-, Dünndarm- und Rectusschleimhaut und vergleichende Serumanalysen.

Klin. Wochenschr. 45, 244, (1967).

56. LAURENT, R., DREYFUS, J. C., SCHAPIRA, G.
Electrophorèse des proteines musculaires extractibles en milieu de faible force ionique. Influence de la section nerveuse.

Bull. Soc. Chim. Biol.
43, 423, (1961).

Electrophorèse de myoglobines. Influence de la section nerveuse.

Bull. Soc. Chim. Biol.
43, 415, (1961).

57. LAURYSSENS, M. C., LAURYSSENS, M. J.
Electrophoretic Distribution Pattern of Lactate Dehydrogenase in Mouse and Human Muscular Dystrophy.

Clin. Chim. Acta 9, 276, (1964).

58. LILLEVIK, H. A. Species Differentiation in Fish by Electrophoretic Analysis of Skeletal Muscle Proteins.

Science 134, 2042, (1961).

59. LOWENTHAL, A., VAN SANDE, M., KARCHER, D.
Protéinogrammes et enzymogrammes des protéines musculaires en pathologie humaine.

Clin. Chim. Acta 9, 31, (1964).

60. Mc DOUGALL, E. I., SYNGE, R. L.
Recent Advances in Electrophoretic Techniques.

Brit. Med. Bull. 22, 115, (1966).

61. Mc RAE, H. F., RANDALL, D. J.
Hydrolytic Enzymes in Bovine Skeletal Muscle. I. Starch Gel Electrophoretic Separation and Properties of Soluble Esterases.

Canad. J. Bioch. 43, 1779, (1965).

62. MANCUSO, V. M. Protein Typing of Some Authentic Fish Species by Disc Electrophoresis.
J. Ass. Agric. Chem. 47, 841, (1964).

63. MATOLTSY, A. G. A Study of the Soluble Proteins of Normal and Pathologic Horny Tissues by a Modified Disc-Electrophoretic Technique.
J. Invest. Derm. 41, 255, (1963).

64. MATSON, Ch. F. Polyacrylamide Electrophoresis: A Simple System Using Gel Columns.
Analyt. Bioch. 13, 294, (1965).

65. MOREAU-COLLINET, C., HAMOIR, G. Influence de la nature du tampon sur les diagrammes électrophorétiques d'extraits musculaires de faible force ionique de lapin.
Arch. Internat. Physiol. 69, 121, (1961).

66. NARAYAN, K. A., et al. A Modified Disc- Electrophoretic Method for Animal Blood Serum Proteins.
J. Chromat. 16, 187, (1964).

67. NARAYAN, K. A., VOGEL, M., LAWRENCE, J. M. Disc Electrophoresis of Wheat Flour Proteins with a Modified Apparatus Utilizing Gels of Rectangular Cross Section.
Analyt. Bioch. 12, 526, (1965).

68. NEELIN, J. M. Characteristics of Discontinuous Starch Gel Electrophoresis Applied to Myogen from Chicken Breast Muscle.
Canad. J. Bioch. 42, 1383, (1964).

69. NELSON, Th. E., HALE, A. Disc Electrophoresis: An Improved Technique.
J. Lab. Clin. Med. 68, 838, (1966).

70. NIKKILA, O. E., LINKO, R. R. Paper Electrophoretic Analysis of Protein Extracted at Low Ionic Strength from Fish Skeletal Muscle.
Bioch. J. 60, 242, (1955).

71. Ott, H. Elektrophorese im Acrylamidgel.
Prot. Biol. Fluids. 10, 305, (1962).

72. ORNSTEIN, L. Disc-Electrophoresis I: Background and Theory.
Ann. N. Y. Acad. Sci. 121, 321, (1964).

73. POULIK, M. D. Starch Gel Electrophoresis in a Discontinuous System of Buffers.
Nature 180, 1477, (1957).

74. Poulik, M. D., SMITHIES, O.
Comparison and Combination of the Starch Gel and Filter Paper Electrophoretic Methods Applied to Human Sera: Two-dimensional Electrophoresis.
Bioch. J. 68, 636, (1958).

75. PUN, J. Y., LOMBROZO, L.
Microelectrophoresis of Brain and Pineal Proteins in Polyacrylamide Gel.
Analyt. Bioch. 9, 9, (1964).

76. RADARKRISHNAMURTHY, B., DALFERES, E. R., BERENSON, G. S.
A Simplified Column for Gel Electrophoresis.
Bioch. Biophys. Acta 107, 380, (1965).

77. RAYMOND, S., WEINTRAUB, L.
Acrylamide Gel as a Supporting Medium for Zone Electrophoresis.
Science 130, 711, (1959).

78. RAYMOND, S., YI-JU WANG.
Preparation and Properties of Acrylamide Gel for Use in Electrophoresis.
Analyt. Bioch. 1, 391, (1960).

79. RAYMOND, S. Acrylamide Gel Electrophoresis.
Ann. N. Y. Acad. Sci. 121, 350, (1964).

80. REICH, G., REBESTREIT, C., WINKLER, J.
Elektrophorese in Polyacrylamidgel.
Zeitschr. f. Chemie 6, 401, (1966).

81. REISFELD, R. A. Disc Electrophoresis of Basic Proteins and Peptides on Polyacrylamide Gel.
Nature 195, 281, (1962).

82. ROBERTS, D., TSUJI, H.
Zone Electrophoretic Separation of Five Phosphoglucomutase Activities from Fish Muscle.
Bioch. Biophys. Acta 72, 675, (1963).

83. ROGERS, L. J. A Simple Apparatus for Disc Electrophoresis.
Bioch. Biophys. Acta 94, 324, (1965).

84. ROSSI-FANELLI, A., ANTONINI, E.
Heterogeneity of Human Myoglobin.
Arch. Bioch. 62, 367, (1956).

85. SANTAMARIA, R., DI BENEDETTO, C., CIOFFI, L. A.
Le proteine muscolari solubili a bassa forza ionica. I: Elettroforesi su carta di proteine di muscolo cardiaco e scheletrico di bovino. II. Elettroforesi su gel di amido.
Boll. Soc. Ital. Biol. Sper. 38, 1375, (1962).

86. SANTAMARIA, R., GRANATO-CORIGLIANO, G., et al.
Le proteine muscolari solubili a bassa forza ionica. III.
Boll. Soc. Ital. Biol. Sper. 39, 2069, (1963).

87. SCHRAUWEN, J. Nachweis von Enzymen nach elektrophoretischer Trennung an Polyacrylamidsäulchen.
J. Chromat. 23, 177, (1966).

88. SCHWABE, Ch. Disc Electrophoresis.
(Destaining, Staining, Protein Recovery).
Analyt. Bioch. 17, 203, (1966).

89. SCOPES, R. K., LAWRIE, R. A.
Post-mortem Lability of Skeletal Muscle Proteins.
Nature 197, 1202, (1963).

90. SMALL, P. A., HARRINGTON, W. F., KIELLEY, W. W.
The Electrophoretic Homogeneity of the Myosin Subunits.
Bioch. Biophys. Acta 49, 462, (1961).

91. SMITHIES, O. Zone Electrophoresis in Starch Gels : Group Variations in the Serum Proteins of Normal Human Adults.
Bioch. J. 61, 629, (1955).

92. SMITHIES, O., WALKER, N. F.
Genetic Control of Some Serum Protein Groups in Normal Humans.
Nature 176, 1265, (1955).

93. SMITHIES, O. An Improved Procedure for Starch Gel Electrophoresis. Further Variations in the Serum Proteins of Normal Individuals.
Bioch. J. 71, 585, (1958).

94. STRICKLAND, R. D. Electrophoresis.
Analyt. Chem. 38, 99 R(1966).

95. TISELIUS, A. Trans. Faraday Soc. 33, 524, (1937).
Bioch. J. 31, 313, (1937).
Kolloid-Z. 85, 129, (1938).

96. Tombs, M. P. The Interpretation of Gel Electrophoresis.
Analyt. Bioch. 13, 121, (1965).

97. VESELL, E. S., BRODY, I. A.
Biological Applications of Lactic Dehydrogenase Isozymes: Certain Methodological Considerations.
Ann. N. Y. Acad. Sci. 121, 544, (1964).

98. VOS, J., VAN DER HELM, H. J.
Electrophoresis of Brain Proteins in Polyacrylamide Gel.
J. Neuroch. 11, 208, (1964).

99. WEINSTEIN, D. A Note on Disc Electrophoresis. Technique.
Analyt. Bioch. 6, 474, (1963).

100. WIEME, R. J., HERPOL, J. E.
Origin of Lactate Dehydrogenase Isoenzyme Pattern Found in the Serum of Patients Having Primary Muscular Dystrophy.
Nature 194, 287, (1962).

101. WIEME, R. J., LAURYSSENS, M. J.
Lactate Dehydrogenase Multiplicity in Normal and Diseased Human Skeletal Muscle.
Lancet i 433, (1962).

102. WIEME, R. J. Agar Gel Electrophoresis.
Elsevier Publishing Company; Amsterdam, London, New York 1965

103. WILLIAMS, D. E., REISFELD, R. A.
Disc Electrophoresis in Polyacrylamide Gels. Extension to New Conditions of pH and Buffer.
Ann. N. Y. Acad. Sci. 121, 373, (1964).

104. WOLLENBERGER, A. Zone Electrophoresis of Muscle Extracts: Separation of Phosphocreatine, Creatine, Beta-Alanin Peptides and Nucleotides.
Nature 173, 205, (1954).

105. SHANDON - Betriebsanleitung zum SHANDON-Acrylamid-Säulenelektrophoresegerät.

Herrn Privatdozent Dr. med. Franz MITTELBACH danke ich für die Überlassung des Themas. Seine Anregungen und Hinweise während des ganzen Verlaufs der Arbeit, sowie seine persönliche Beratung bedeuteten für mich eine wesentliche Unterstützung bei der Fertigstellung vorliegender Dissertation.

L E B E N S L A U F

Am 20.1.1941 wurde ich in Hochstadt Main als Sohn des Revisors Rupert A n t l und dessen Ehefrau Katharina, geb. S p r i n g e r geboren.
Die ersten beiden Klassen der Volksschule besuchte ich 1947/48 in Peißenberg und anschließend die Klassen 3 - 5 von 1949 bis 1952 in Weilheim Obb. 1952 trat ich in die damalige Ludwigsoberrealschule in München ein und legte dort im Jahre 1961 die Reifeprüfung ab.
Im Wintersemester 1961/62 studierte ich an der Univ rsität München Mathematik und wechselte dann im Sommersemester 1962 auf das Studium der Medizin über. Das Physikum bestand ich nach sechs vorklinischen Semestern im Frühjahr 1965.
Mit meiner Doktorarbeit begann ich im März 1966 und beendete sie im Oktober 1967.
Die ärztliche Prüfung legte ich im Sommer 1968 an der Universität München ab.